

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA FABRICIO DE MELO

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO 7-
SEMELHANTE A 2 (*TCF7L2*) E DO GENE ASSOCIADO À MASSA ADIPOSA E
OBESIDADE (*FTO*) NO DIABETES GESTACIONAL**

CURITIBA

2013

SANDRA FABRICIO DE MELO

**ESTUDO DE VARIAÇÕES DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO 7-
SEMELHANTE A 2 (*TCF7L2*) E DO GENE ASSOCIADO À MASSA ADIPOSA E
OBESIDADE (*FTO*) NO DIABETES GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego

CURITIBA

2013

Melo, Sandra Fabricio de

Estudo de variações do gene do fator de transcrição 7 – semelhante a 2 (*TCF7L2*) e do gene associado à massa adiposa e obesidade (*FTO*) no diabetes gestacional / Sandra Fabricio de Melo - Curitiba, 2013.

113 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. Polimorfismos de nucleotídeo único. 3. SNP. 4. Biomarcadores. I. Picheth, Geraldo. II. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

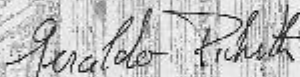
CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

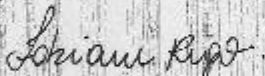
SANDRA FABRICIO DE MELO

Título: "ESTUDO DE VARIAÇÕES DO GENE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO 7-SEMELHANTE A 2 (TCF7L2) E DO GENE ASSOCIADO À MASSA ADIPOSITIVA E OBESIDADE (FTO) NO DIABETES GESTACIONAL"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof. Dr. Geraldo Picheth
Orientador



Prof.ª Dr.ª Fabiane Gomes de Moraes Rego
Co-orientadora



Prof.ª Dr.ª Dayane Alberton
Universidade Federal do Paraná



Prof.ª Dr.ª Kátia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 21 de outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Sem minha família e poucos e bons amigos eu não sou nada!

Agradeço ao Prof. Dr. Geraldo Picheth e à Prof^a. Dra^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego, meus queridos e adorados orientadores, que por sua humanidade, compreensão e capacidade profissional indescritíveis, dispensam quaisquer comentários!

A Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss, Henrique R. Frigeri e Kátia Cristina Boritza, Mestres em Ciências Farmacêuticas, sem a ajuda técnica dos quais esta dissertação não teria sido concluída. Vocês foram mais que irmãos!

Enfim, muito obrigada a todos vocês, do fundo do coração, serei eternamente grata!

A meus queridos e amados pais, Marise (*in memorian*) e Silas, que desdobraram-se em cuidados aos filhos, para torná-los pessoas educadas e decentes. Agradeço a meu pai pelo esforço de uma vida de trabalho para dar a melhor educação possível aos filhos; algumas vezes chegou a não poder participar da minha infância por conta de seu trabalho extenuante. A minha mãe, sempre tão feliz e cheia de vida, que me deixou tão cedo, serei eternamente grata por ter aberto mão de sua vida profissional em prol de formar uma família e criar os filhos da maneira como sempre sonhou: feliz, cheia de amor, cuidados e agrados. Se esta mulher maravilhosa tivesse prosseguido com sua vida profissional tenho certeza de que seria uma grande executiva, brilhante e invejada. Quando penso em meus pais lembro de um ditado popular que diz "Ao lado de um grande homem existe uma grande mulher". Tenho que agradecer de forma especial a Deus, que me deu a oportunidade de nascer nesta família tão especial, e poder, bem como saber, aproveitar as oportunidades profissionais que esta boa educação e orientação me trouxeram.

A minha tia materna Marli, exemplo de mulher forte e revolucionária, professora das mais capacitadas, que esteve presente em todas as etapas da minha vida e educação. Ao seu marido Nabil, a quem eu amava de uma forma tão especial, apesar da não consanguinidade, de sua vivência e conselhos tão diretos e certos que deixavam a vida tão mais simples! "Querida, a vida é bela", dizia ele.

Aos meus avós maternos, Angélica e Anthero (ambos *in memorian*), pessoas simples que não tiveram acesso a uma educação mais refinada, mas que tinham

grande sabedoria. Indubitavelmente meu avô Anthero foi a pessoa que mais teve orgulho de mim desde o dia do meu nascimento até o do seu falecimento.

A meus avós paternos, Leonor e Constantino (ambos *in memoriam*), por terem gerado meu pai, sem o qual eu não estaria aqui. Apesar da aparente austeridade do meu avô, era um doce de pessoa, que me deixava comer pão com açúcar em sua casa, hábito abominado pelo meu pai. Minha avó Leonor, não a conheci, mas meu muito obrigada!

A minha amada e adorada irmã Marcia, por ter dividido a vida desde o ventre materno, por ser minha melhor amiga, confidente, conselheira e companheira nos momentos mais felizes, bem como nos mais tristes, de nossas vidas.

Ao meu irmão Daniel, obrigada pela infância deliciosa que compartilhamos. Lamento que tudo tenha mudado tanto!

A minha irmã Júlia Vitória, que o esforço que tive que fazer para retomar a vida e finalizar esta dissertação sirva de exemplo para que se torne uma mulher forte, decidida, dedicada a seus objetivos, e profissional de grande valor, independente do campo em que atue.

A Alcioni, esposa do meu pai, que se mostrou amiga do coração e protetora neste ano difícil que passei por tantas provações de caráter pessoal.

Ao eterno amigo Edson Oyola, pelo incentivo, amizade e carinho.

A Marina e Lena, fiéis auxiliares do lar, que fazem comidinhas gostosas para me agradar e mantêm minha casa organizada. Desde que eu me conheço por gente elas fazem parte da minha vida e as amo!

As minhas queridas médicas Dr^a. Lidia Fabricio de Melo Garbers e Dr^a. Maristela Vanessa Landal, que além de cuidarem da minha saúde, são pessoas maravilhosas que sempre acreditaram em mim.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Francisco de Paula Cândido Xavier

RESUMO

O *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG) está relacionado à intolerância à glicose, com início ou primeiro diagnóstico, durante a gestação. O DMG é um relevante problema de saúde pública, afetando cerca de 7% das gestações, e está relacionado a complicações para a mãe e para o feto/neonato, tanto durante a gestação, quanto durante o parto. O diagnóstico precoce e o tratamento do DMG visam reduzir a morbimortalidade materna e fetal. O objetivo do trabalho foi associar a variabilidade genética de sítios polimórficos selecionados dos genes *TCF7L2* (gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2; rs12255372 e rs7903146) e *FTO* (gene associado à massa adiposa e obesidade; rs9939609 e rs8050136) com o DMG, em estudo do tipo caso-controle, bem como com biomarcadores associados à patologia. A amostra foi composta por 400 gestantes, sendo o grupo com DMG (n=200) com diagnóstico de acordo com os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), e o grupo controle composto por gestantes saudáveis (n=200). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob o Registro CEP/SD: 1045.170.10.11 e CAAE: 5876.0.000.091-10. Os grupos controle e DMG divergiram significativamente quanto à idade, peso e índice de massa corporal (IMC). A etnia euro-brasileira predomina (88%) entre as pacientes com DMG. As concentrações de glicemia de jejum foram significativamente diferentes entre os grupos controle e DMG, sendo mais elevada no grupo DMG. A concentração média de hemoglobina glicada no grupo com DMG (5,7%) indica que as pacientes diabéticas apresentam bom controle glicêmico, na média. As concentrações de 1,5 anidroglicitol (1,5 AG) foram menores no grupo DMG, confirmando um controle glicêmico pós-prandial menos efetivo (24-72 horas) neste grupo. As concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides entre os grupos controle e DMG foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), sendo estes lípidos mais elevados no grupo com DMG. As genotipagens das variações dos genes *TCF7L2* e *FTO* foram realizadas com sondas fluorescentes específicas (sistema *TaqMan*[®]). Os polimorfismos estudados estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as distribuições genotípicas e alélicas entre os grupos em estudo. As frequências dos alelos raros (95%IC) em gestantes saudáveis para os polimorfismos do gene *FTO* foram: rs8050136 (39%; 34-44%) e rs9939609 (40%; 35-45%), e para os polimorfismos do gene *TCF7L2* foram: rs12255372 (30%; 26-35%) e rs7903146 (29%; 25-34%), sendo similares às descritas para outras populações caucasóides, e maiores quando comparados a populações asiáticas. Os genótipos de risco TT dos polimorfismos rs7903146 e rs12255372 do gene *TCF7L2* foram associados à menor concentração sérica de 1,5 AG, sugerindo que estes indivíduos apresentam um controle glicêmico menos eficiente. O genótipo AA do polimorfismo rs8050136 do gene *FTO* foi associado a um maior IMC no grupo com DMG. Em síntese, os polimorfismos de nucleotídeo único em estudo não estão associados ao diabetes gestacional na população em estudo.

Palavras chave: diabetes gestacional, polimorfismos de nucleotídeo único, SNP, biomarcadores.

ABSTRACT

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is related to glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy. The GDM is an important public health problem, affecting about 7% of pregnancies, and promotes complications to mother and fetus/neonate, both during pregnancy and childbirth. Early diagnosis and treatment of GDM aim to reduce maternal and fetal morbidity and mortality. The purpose of this study was to associate the genetic variability of polymorphic sites of the genes *TCF7L2* (Transcription factor 7-like 2 gene; rs12255372 and rs7903146) and *FTO* (Fat mass and obesity associated gene; rs9939609 and rs8050136) with GDM, in a case-control study, as well as with biomarkers associated with disease. The sample consisted of 400 pregnant women classified as healthy (control group, n = 200) and patients with gestational diabetes (GDM group, n =200) according to the Brazilian Diabetes Society criteria, 2009. The project was approved by the Ethics Committee in Human Research of the HC-UFPR (CEP/SD: 1045.170.10.11 and CAAE: 5876.0.000.091-10). Women in the GDM and control groups differed significantly in age, weight and body mass index (BMI). The Euro-Brazilian ethnicity predominates (88%) among patients with GDM. The concentrations of fasting glucose were significantly different between the control and DMG groups, being higher in the last one. The mean concentration of glycated hemoglobin in GDM group (5,7%) indicates a group with good glycemic control. Concentrations of 1,5 anhydroglucitol (1,5 AG) were lower in GDM group, confirming glycemic control less effective in this group. Serum concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides between control and DMG groups were significantly different ($P<0.05$), and these lipids were higher in the group with GDM. The genotyping of variations in the genes *TCF7L2* and *FTO* were performed with specific fluorescent probes (*TaqMan*[®] system). The studied polymorphisms are in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium in both groups. There were no significant differences ($P>0.05$) between the allele and genotype distributions among the studied groups. The frequencies of rare alleles (95% CI) in healthy pregnant women for the *FTO* gene polymorphisms were: rs8050136 (39%, 34-44%) and rs9939609(40%, 35-45%), and for the *TCF7L2* gene polymorphisms were: rs12255372(30%; 26-35%) and rs7903146 (29%, 25 to 34%), all similar to those reported for other caucasian populations, and higher when compared to asian populations. The risk genotypes TT of the polymorphisms rs7903146 and rs12255372 of the *TCF7L2* gene were associated with lower serum 1,5 AG, suggesting that these individuals show a less effective glycemic control. The AA genotype of the polymorphism rs8050136 of the *FTO* gene was associated with a higher BMI in the group with GDM. In summary, the single nucleotide polymorphisms studied are not associated with gestational diabetes in the study population.

Keywords: Gestational diabetes, single nucleotide polymorphisms, SNP, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>FTO</i> NO CROMOSSOMO 16.....	34
FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO <i>FTO</i> E SEUS GENES ADJACENTES.....	35
FIGURA 3 – INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA EXPRESSÃO DO GENE <i>FTO</i>	37
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>TCF7L2</i> NO CROMOSSOMO 10.....	46
FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DESTAQUE PARA O SÍTIO DE LOCALIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.	46
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO CANÔNICA <i>WNT</i>	48
FIGURA 7 - PRINCÍPIO DA GENOTIPAGEM COM SONDAS FLUORESCENTES COM O SISTEMA <i>TAQMAN</i> ®.....	59
FIGURA 8 - PRINCÍPIO DO ENSAIO DE <i>TAQMAN</i> ®.....	60
FIGURA 9 - EXEMPLO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA COM O SISTEMA DE SONDAS FLUORESCENTES <i>TAQMAN</i> ®.....	62
FIGURA 10 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>RS7903146</i> DO GENE <i>TCF7L2</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES.....	71
FIGURA 11 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>RS7903146</i> DO GENE <i>TCF7L2</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE 1,5 ANIDROGLUCITOL	72
FIGURA 12 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>RS12255372</i> DO GENE <i>TCF7L2</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE 1,5 ANIDROGLUCITOL	73
FIGURA 13 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO <i>RS8050136</i> DO GENE <i>FTO</i> SOBRE O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC).	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE RISCO PARA O DM2	23
TABELA 2 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES	23
TABELA 3 - FATORES DE RISCO PARA O DMG	25
TABELA 4 - CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL	26
TABELA 5 - PREVALÊNCIA DO DMG EM DIFERENTES POPULAÇÕES	29
TABELA 6 – GENES, POLIMORFISMOS ANALISADOS E MÉTODO DE GENOTIPAGEM	57
TABELA 7 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM O SISTEMA TAQMAN®	61
TABELA 8 - CICLOS TÉRMICOS DE REAÇÃO PARA AS ANÁLISES DE TAQMAN® - SISTEMA STEPONEPLUS™	61
TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS DA AMOSTRA EM ESTUDO	64
TABELA 10 - COMPARAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	65
TABELA 11 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS RS12255372 E RS7903146 DO GENE <i>TCF7L2</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIABETES GESTACIONAL	66
TABELA 12 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS RS8050136 E RS9939609 DO GENE <i>FTO</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIABETES GESTACIONAL	67
TABELA 13 - VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA OS POLIMORFISMOS RS12255372 E RS7903146 DO GENE <i>TCF7L2</i>	68
TABELA 14 - VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA OS POLIMORFISMOS RS9939609 E RS8050136 DO GENE <i>FTO</i>	69
TABELA 15 - ANÁLISES DE VARIÂNCIA SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS BIOMARCADORES EM ESTUDO E GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>TCF7L2</i>	70

TABELA 16 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS9939609 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	87
TABELA 17 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS8050136 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	90
TABELA 18 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS7903146 DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DADOS DA LITERATURA	92
TABELA 19 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS12255372 DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DADOS DA LITERATURA	94

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.....	110
ANEXO 2	Método de extração de DNA genômico	111

LISTA DE ABREVIATURAS

1,5 AG	1,5 anidroglucitol
2-h 75g de glicose	Dosagem de glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose
ADA	American Diabetes Association, Associação Americana de Diabetes
ADIPOQ gene	Adiponectin gene
ADRB3 gene	β -3 adrenergic receptor gene
CAPN10 gene	Calpain 10 gene
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Clearance	Remoção
DAC	Doença Arterial Coronariana
DM	Diabetes Mellitus, Diabetes melito
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
EASD	Associação Europeia para o Estudo do Diabetes
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FOXC2 gene	Forkhead box C2 gene
FT	Fused Toes, dedos unidos
FTO	Fat mass and obesity associated gene, gene associado à massa adiposa e obesidade
FZD	Frizzled (encaracolado, em tradução livre), receptores de superfície celular
GAD	Glutamic Acid Decarboxilase, descarboxilase do ácido glutâmico
GCK gene	Glucokinase gene
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLUT1 gene	Glucose transporter 1 gene
GS3K3B	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HBA1C	Hemoglobina Glicada fração A1C

HC	Hospital de Clínicas
HDL-C	HDL- Colesterol, <i>High Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , Antígeno leucocitário humano
HNF1A gene	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha gene</i>
HNF1B gene	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 Home box B gene</i>
HNF4A gene	<i>Hepatocyte nuclear factor 4, alpha gene</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF2 gene	<i>Insulin-like growth fator 2 gene</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
INS gene	<i>Insulin gene</i>
INSR gene	<i>Insulin receptor gene</i>
IPF1 gene	<i>Insulin Promoter Factor gene</i>
IRS1 gene	<i>Insulin receptor substrate 1gene</i>
KCNJ11 gene	<i>Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11gene</i>
LDL-C	LDL-Colesterol, <i>Low Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
log (TG/HDL-C)	log (triglicérides/HDL-Colesterol)
LRP	<i>Lipoprotein-Related Protein</i> , receptores de superfície celular
MBL2 gene	<i>Mannose-Binding Lectin Protein C gene</i>
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> , Diabetes da maturidade de início precoce
ND1 gene	<i>Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1 gene</i>
NDDG	<i>National Diabetes Data Group</i>
NEUROD1 gene	<i>Neuronal Differentiation 1 gene</i>
NGSP	Programa Nacional para Padronização da hemoglobina glicada, Norte Americano
NICE	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

<i>P</i>	Probabilidade
<i>PAI-1 gene</i>	<i>Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 gene</i>
<i>PCR</i>	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PPARG gene</i>	<i>Peroxisome proliferative activated receptor-gamma gene</i>
<i>PPARGC1A gene</i>	<i>Peroxisome proliferative activated receptor-gamma coactivator 1-alpha gene</i>
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
<i>Probes</i>	Sondas
<i>Quencher</i>	Silenciador
<i>r</i>	Coeficiente de correlação
<i>SBD</i>	Sociedade Brasileira de Diabetes
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , polimorfismo de único nucleotídeo
<i>SUS</i>	Sistema Único de Saúde
<i>TCF4</i>	<i>Transcription factor 4</i> , fator de transcrição 4
<i>TCF7L2</i>	<i>Transcription factor 7-like 2 gene</i> , gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2
<i>TCLE</i>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TOTG</i>	Teste Oral de Tolerância à Glicose
<i>UCP2 gene</i>	<i>Uncoupling protein-2 gene</i>
<i>UFPR</i>	Universidade Federal do Paraná
<i>VLDL-C</i>	VLDL-Colesterol, <i>Very Low Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>Wnt</i>	<i>Wnt signaling pathways</i> , cascata de sinalização Wnt, termo que provém da combinação de Wg e INT, genes que codificam proteínas de integração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 <i>DIABETES MELLITUS</i> (DM)	19
3.2 CLASSIFICAÇÃO DO DM E OUTRAS CATEGORIAS DE REGULAÇÃO DA GLICOSE	20
3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DM	21
3.4 <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL (DMG)	22
3.4.1 Definição do DMG	22
3.4.2 Fisiopatologia do DMG	23
3.4.3 Diagnóstico do DMG	26
3.4.4 Frequência do DMG	28
3.4.5 Complicações do DMG	29
3.4.6 Tratamento do DMG	31
3.5 GENES NO DMG	32
3.6 GENE <i>FTO</i>	33
3.6.1 Nomenclatura	33
3.6.2 Localização	34
3.6.3 Função e expressão tecidual do gene <i>FTO</i>	35
3.6.4 Polimorfismos selecionados para estudo	37
3.6.5 Estudos de associação com os <i>SNPs</i> rs9939609 e rs8050136 do gene <i>FTO</i>	37
3.7 GENE <i>TCF7L2</i>	45
3.7.1 Localização	45
3.7.2 Função e expressão tecidual	47
3.7.3 Polimorfismos selecionados para estudo	49
3.7.4 Estudos já conduzidos com <i>SNPs</i> para o gene <i>TCF7L2</i>	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL	54
4.1.1 Critérios para caracterização da amostra	54

4.1.2 Grupo de gestantes com diagnóstico de DMG.....	55
4.1.3 Grupo controle.....	55
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	56
4.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	56
4.3.1 Variabilidades genéticas em estudo.....	56
4.3.2 Isolamento do DNA genômico.....	57
4.3.3 Determinação da concentração das suspensões de DNA genômico.....	57
4.3.4 Métodos moleculares.....	58
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	64
5.2 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	65
5.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	66
5.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON.....	68
5.5 ANÁLISES DE VARIÂNCIA.....	69
6 DISCUSSÃO.....	75
6.1 PARÂMETROS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	75
6.1.1 Idade.....	75
6.1.2 Etnia.....	76
6.1.3 Semanas de gestação ao diagnóstico do DMG.....	76
6.1.4 Peso, altura e IMC.....	77
6.1.5 Pressão arterial.....	78
6.1.6 Tabagismo.....	79
6.1.7 Uso de insulina.....	79
6.1.8 Fator de risco para diabetes.....	79
6.1.9 História familiar de diabetes e DAC.....	80
6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	80
6.2.1 Marcadores glicêmicos.....	80
6.2.2 Perfil lipídico.....	82
6.2.3 Proteína total e albumina.....	84
6.2.4 Ureia e creatinina.....	85
6.2.5 Ácido úrico.....	86
6.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	86
6.3.1 Polimorfismo rs9939609 do gene <i>FTO</i>	86

6.3.2 Polimorfismo <i>rs8050136</i> do gene <i>FTO</i>	89
6.3.3 Polimorfismo <i>rs7903146</i> do gene <i>TCF7L2</i>	91
6.3.4 Polimorfismo <i>rs12255372</i> do gene <i>TCF7L2</i>	94
6.3.5 Comparações entre os polimorfismos genéticos estudados e parâmetros clínicos, antropométricos e bioquímicos para os grupos em estudo.....	95
7 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a média de custos totais com o *Diabetes Mellitus* (DM) ao sistema único de saúde (SUS), entre 2008 e 2010, foram de US\$ 23,7 milhões, sendo US\$ 851,715 mil referentes aos custos ambulatoriais, e US\$ 21,8 milhões referentes à hospitalização (BAHIA *et al.*, 2012). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, os custos globais estimados para o ano de 2010 relacionados à patologia foram de US\$ 376 bilhões. Nos Estados Unidos e América Latina, os custos anuais diretos e indiretos associados à atenção aos portadores de DM totalizaram US\$ 102,5 e US\$ 94,3 bilhões, respectivamente. Análises de custo do tratamento para o DM em países latino-americanos também demonstraram uma significativa carga econômica da patologia aos sistemas de saúde (MARINHO *et al.*, 2011). Este elevado custo é justificado pela alta permanência hospitalar, associada à severidade das complicações da patologia, o que demanda procedimentos altamente complexos.

Desta forma, o diagnóstico precoce do paciente diabético, e a instituição de tratamento e monitoramento adequados propiciam, além de benefícios ao indivíduo (redução na gravidade e frequência das complicações), uma substancial redução nos custos ao sistema de saúde. As técnicas de biologia molecular, de uso crescente, são atualmente indispensáveis na pesquisa e diagnóstico clínico. Por meio destes testes moleculares podem ser identificados polimorfismos (variantes genéticas) em uma população, e variáveis raras associadas a processos patológicos (BRYAN, 2007). Ou seja, pesquisas envolvendo o estudo de marcadores confiáveis e sensíveis, no que se refere ao diagnóstico, tratamento e prognóstico da patologia, são de extrema importância.

Mais especificamente a respeito do DM gestacional (DMG), que é o foco do presente estudo, sabe-se que a gestação é um quadro de estresse ambiental que pode potencializar a progressão a um estado diabético em mulheres com predisposição genética (ROBITAILLE e GRANT, 2008). No entanto, pouco se conhece a respeito das bases genéticas do DMG (WATANABE *et al.*, 2007).

O estudo da variabilidade genética associada ao DMG pode auxiliar no diagnóstico molecular da patologia, fornecendo um melhor entendimento a respeito dos mecanismos que contribuem para a fisiopatologia da doença, propiciando um diagnóstico precoce, o aperfeiçoamento das ações de prevenção e tratamento do

DMG, além da minimização das complicações da patologia tanto para a mãe quanto para o feto/neonato.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Associar a variabilidade genética de sítios polimórficos selecionados dos genes *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*; fator de transcrição 7-semelhante a 2) e *FTO* (*Fat mass and obesity associated*; gene associado à massa adiposa e obesidade) com o diabetes gestacional, em uma população do sul do Brasil, em estudo do tipo caso-controle, bem como com marcadores de risco/proteção associados à patologia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter amostras de pacientes com diabetes gestacional e gestantes saudáveis (grupo controle), bem como dados antropométricos.
- Genotipar as variações dos genes em estudo utilizando sondas fluorescentes específicas (sistema *TaqMan®* -*Applied Biosystems*).
- Confirmar as variantes genéticas em estudo, quando pertinente, por meio de sequenciamento do DNA.
- Correlacionar as variabilidades genéticas em estudo com as concentrações séricas de biomarcadores associados ao controle glicêmico, e a fatores de risco e proteção do diabetes.
- Avaliar a possibilidade do uso diagnóstico das variações genéticas em estudo como marcadores de risco ou proteção para o diabetes gestacional na população em estudo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *DIABETES MELLITUS* (DM)

O DM não é uma doença única, e sim um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na sua ação, ou em ambos. Secreção prejudicada da insulina e defeitos na sua ação frequentemente coexistem no mesmo paciente, e geralmente não é claro qual anormalidade é a causa primária da hiperglicemia (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION- ADA*, 2012).

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes. A base das anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas variam desde a destruição autoimune das células beta pancreáticas, com consequente deficiência de insulina, a anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina, ou seja, resposta tecidual reduzida à insulina (*WILD et al.*, 2004; *ADA*, 2012).

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a lesões de longo termo, disfunções e falhas de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Complicações de longo termo do diabetes incluem retinopatia, com potencial perda da visão; nefropatia, levando à insuficiência renal; neuropatia periférica com risco de ulcerações nos pés e amputações; neuropatias autonômicas causando sintomas gastrintestinais, geniturinários e cardiovasculares (doença cardiovascular aterosclerótica, arterial periférica e cerebrovascular), além de disfunção sexual. Crescimento prejudicado e suscetibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica. Hipertensão e anormalidades do metabolismo de lipoproteínas são igualmente encontradas em indivíduos portadores de diabetes (*ADA*, 2012).

Sintomas de hiperglicemia marcante incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, algumas vezes com polifagia, e visão turva. Consequências agudas, ameaçadoras à vida, do diabetes não controlado são a hiperglicemia com cetoacidose e a síndrome hiperosmolar não-cetótica (*ADA*, 2012).

Salienta-se que a maioria dos pacientes com diabetes, principalmente aqueles com DM2, não apresenta as manifestações clássicas da patologia (DIB,

2008), sendo nestes pacientes o diabetes diagnosticado por determinações de glicemia associadas à prevenção, ou, mais raramente, devido a manifestações clínicas como rápida redução da acuidade visual, infecções de repetição e dificuldade na cicatrização de lesões (BEN-HAROUSH *et al.*, 2004).

3.2 CLASSIFICAÇÃO DO DM E OUTRAS CATEGORIAS DE REGULAÇÃO DA GLICOSE

De acordo com a SBD (2006) e ADA (2013), a classificação atual do DM é baseada em sua etiologia, e não no tipo de tratamento, e inclui quatro classes clínicas:

- a) Diabetes tipo 1 (DM1): forma presente em 5-10% dos casos, sendo resultante de uma deficiência absoluta de insulina. Na maioria dos casos observa-se destruição autoimune das células β pancreáticas, relacionada a múltiplas predisposições genéticas e também a fatores ambientais, ainda pouco definidos. Porém, existem casos em que não há evidências de processos autoimunes, sendo assim referida como forma idiopática de diabetes tipo 1. Indivíduos com risco aumentado de desenvolver este tipo de diabetes podem ser identificados por evidências sorológicas de um processo patológico autoimune e por marcadores genéticos.

Marcadores de destruição imune das células β incluem anticorpos anti-células das ilhotas, anticorpos anti-insulina, anticorpos anti-GAD (*Glutamic Acid Decarboxilase*) e anticorpos anti-tirosinafosfatase. Um ou mais destes anticorpos estão presentes em 85-90% dos indivíduos quando a hiperglicemia de jejum é inicialmente detectada.

A patologia tem forte associação com o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), com ligação aos genes DQA e DQB, e é influenciada pelos genes DRB. Os alelos HLA-DR/DQ podem ser tanto predisponentes quanto protetores.

- b) Diabetes tipo 2 (DM2): categoria de maior prevalência, estando presente em 90-95% dos casos. Caracteriza-se pela combinação de resistência à ação da insulina a uma resposta compensatória inadequada de secreção da insulina. Há provavelmente várias diferentes causas desta forma de diabetes, porém,

embora sua etiologia específica não seja conhecida, a destruição autoimune das células β não ocorre.

O risco de desenvolver este tipo de diabetes aumenta com a idade, obesidade/sobrepeso e falta de atividade física. A maioria dos pacientes portadores desta forma de diabetes é obesa, e a obesidade, por si só, causa algum grau de resistência à insulina.

Ocorre geralmente em mulheres com DM gestacional prévia, e indivíduos com hipertensão e dislipidemia.

Está associada a uma forte predisposição genética, que é complexa e não está claramente definida, e sua frequência varia em diferentes subgrupos étnicos/raciais.

- c) Outros tipos específicos de diabetes: pertencem a esta classificação formas menos comuns de DM, cujos processos causadores podem ser identificados. A apresentação clínica deste grupo é bastante variada, dependendo da alteração de base. Estão incluídos nesta categoria defeitos genéticos na função das células beta (diabetes tipo *MODY* - *Maturity-Onset Diabetes of the Young*), defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes mediadas pelo sistema imune e síndromes genéticas associadas ao diabetes.
- d) *Diabetes mellitus* gestacional (DMG), que será abordada posteriormente.

3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DM

O DM vem se tornando a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo, portanto, uma epidemia da patologia está em curso. Projeta-se que existirão 438 milhões de indivíduos afetados pela patologia em 2030, contabilizando por mais de 4,5% da população mundial. Este número está aumentando em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, e à maior sobrevida do paciente diabético (SBD, 2006; GIRGIS *et al.*, 2012).

A mortalidade mundial atribuída ao DM está em torno de 800 mil/ano, porém esta quantidade de óbitos é subestimada, uma vez que o DM não é mencionado na

declaração de óbito, e sim suas complicações cardio e cerebrovasculares (WILD *et al.*, 2004; SBD, 2006).

3.4 *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL (DMG)

3.4.1 Definição do DMG

Por muitos anos o DMG foi definido como qualquer grau de intolerância à glicose, de magnitude variável, com início, ou primeiro diagnóstico, durante a gestação, e que pode ou não persistir após o parto, embora a maioria dos casos resolva-se com o nascimento. Este conceito não exclui a possibilidade da condição existir antes da gravidez, porém, não ter sido diagnosticada (SBD, 2009; ADA, 2012).

Tal definição tem sido assunto de controvérsias consideráveis, uma vez que os critérios diagnósticos para o DMG foram estabelecidos há mais de 40 anos, e, com pequenas modificações, permanecem em uso até os dias de hoje. Estes critérios não foram propostos para identificar gestantes que apresentam risco aumentado de eventos perinatais adversos, mas sim mulheres que apresentam elevado risco de desenvolver DM2 após a gestação (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 2008).

Com base na realidade atual, na qual a epidemia de obesidade e diabetes em curso tem levado a uma maior incidência de DM2 em mulheres em idade reprodutiva, o número de gestantes com DM2 não diagnosticada vem aumentando progressivamente. Desta forma é adequado pesquisar o diabetes em mulheres com fatores de risco (TABELA 1) para o DM2 em sua primeira consulta pré-natal, utilizando-se critérios diagnósticos padronizados (TABELA 2). Assim, no ano de 2012, a ADA propôs modificações, e estabeleceu que as mulheres diagnosticadas como diabéticas nesta primeira consulta devem receber o diagnóstico evidente de DM2, e não mais de DMG.

TABELA 1 - FATORES DE RISCO PARA O DM2

- Inatividade física
- Parente de primeiro grau com diabetes
- Raça étnica de alto risco (afro-americanos, latinos, americanos nativos, americanos asiáticos e habitantes das ilhas do Pacífico)
- Hipertensão (pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg ou em terapia para hipertensão)
- Concentração de colesterol HDL < 35 mg/dL e/ou concentração de triglicerídeos > 250 mg/dL
- Mulheres com síndrome do ovário policístico
- Outras condições clínicas associadas à resistência à insulina (obesidade severa)
- História de doença cardiovascular

Fonte: Adaptado de ADA, 2012.

TABELA 2 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES

Critério	Comentários
Hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$	Ensaio em laboratório certificados pelo NGSP (Programa Nacional para Padronização da Glicohemoglobina, Norte Americano)
ou	
Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl	Jejum é definido como ausência de ingestão calórica por, no mínimo, 8h*
ou	
Glicemia 2-horas após 75g oral ≥ 200 mg/dl	O teste deve ser realizado como preconizado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), utilizando um aporte de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água *
ou	
Glicemia plasmática randômica ≥ 200 mg/dl	Em um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia) ou crise hiperglicêmica.

* Na ausência de hiperglicemia inequívoca, o resultado deve ser confirmado repetindo-se o teste.

Fonte: Adaptado de ADA, 2013.

3.4.2 Fisiopatologia do DMG

A forte associação entre o DMG e o DM2, e o fato de muitos fatores de risco (história familiar de diabetes, índice de massa corporal (IMC) elevado, idade avançada e origem asiática e afro-descendente) serem os mesmos, sugerem que as duas patologias apresentam patogêneses semelhantes (KORPI-HYÖVÄLTI *et al.*, 2012).

A mulher está submetida a alterações fisiológicas significativas durante a gestação, o que permite ao feto sobreviver e desenvolver-se no ambiente intrauterino. Uma importante alteração fisiológica que ocorre em gestações saudáveis é o aumento da resistência à insulina ao longo da gestação. No final da gestação a sensibilidade à insulina reduz-se a um terço, comparativamente ao estado não gravídico. Esta resistência à insulina aumentada facilita a transferência contínua de glicose ao feto. No entanto, quando a resistência à insulina é acompanhada por insuficiência das células β pancreáticas, o DMG pode se desenvolver. Portanto, nota-se que as alterações fisiopatológicas do DMG são similares às observadas no DM2, que também é caracterizado por resistência periférica à insulina, acompanhada por prejuízos na sua secreção (BEN-HAROUSH, YOGEV e HOD, 2003; ROBBITAILLE e GRANT, 2008).

Mauad Filho *et al.* (1998), Maganha *et al.* (2003) e Buchanan *et al.* (2007) complementam que a resistência à insulina que ocorre na gestação pode resultar da combinação de adiposidade materna aumentada, associada aos efeitos dessensibilizantes à ação da insulina, ocasionados pelos hormônios diabetogênicos (bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina), como estrogênio, prolactina, progesterona, cortisol, somatomamotrofina coriônica e hormônio lactogênico placentário. De acordo com Torloni *et al.* (2008), defeitos nos receptores e pós-receptores de insulina associados à obesidade podem estar exacerbados na gestação. Inflamação é outra possível explicação para a ligação entre obesidade e DMG. Embora não se saiba o mecanismo exato desta associação, sabe-se que a abundância de adipócitos em gestantes obesas pode secretar excesso de citocinas pró-inflamatórias, que vão levar ao desenvolvimento de DMG.

À medida que a gestação evolui, o aumento na resistência tecidual à insulina gera uma demanda por mais insulina. Nas gestações que transcorrem dentro de padrões de normalidade, isto é compensado pelo aumento da secreção pancreática de insulina, sendo, desta forma, o balanço entre resistência à insulina e seu fornecimento mantido. No entanto, em pacientes com alterações no metabolismo de carboidratos prévias à gestação, e naquelas que não se adaptam às alterações fisiológicas da gravidez, há predomínio da resistência à insulina, e a mulher torna-se hiperglicêmica. Isto normalmente ocorre na metade final da gestação, com a resistência à insulina aumentando progressivamente até o parto, quando, na maioria

dos casos, rapidamente desaparece (MAUAD FILHO *et al.*, 1998; BEN-HAROUSH, YOGEV e HOD, 2003).

Vários fatores de risco associados ao DMG estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - FATORES DE RISCO PARA O DMG

Fatores maternos
• Idade avançada
• Multíparas
• Peso elevado na gestação
• Ganho de peso excessivo durante a gestação
• IMC $\geq 27 \text{ kg/m}^2$
• Baixa estatura
• Baixo peso ao nascer
• Síndrome do ovário policístico
• Alto consumo de gordura saturada
História familiar
• História familiar de diabetes
• Mãe com histórico de diabetes gestacional
Achados prévios
• Malformação congênita
• Natimorto
• Macrosomia
• Parto cesáreo
• Diabetes gestacional prévia
Fatores gestacionais
• Hipertensão
• Gestação múltipla
• Reservas de ferro elevadas

FONTE: BEN-HAROUSH, YOGEV e HOD, 2003.

Buchanan e Xiang (2005) complementam as informações de Ben-Haroush, Yogev e Hod (2003), salientando categorias de risco do DMG, mostradas na TABELA 4.

TABELA 4 - CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL

Categoria do risco	Características clínicas
Risco Alto (a presença de qualquer dos fatores é suficiente para o enquadramento nesta categoria)	<ul style="list-style-type: none"> • Obesidade marcante • Diabetes em familiares de primeiro grau • História pessoal de intolerância à glicose • Gestação anterior com neonato macrossômico • Presença de glicosúria
Risco Médio	<ul style="list-style-type: none"> • Não se enquadra como risco alto ou baixo
Risco Baixo (necessário apresentar todas as características)	<ul style="list-style-type: none"> • Idade < 25 anos • Etnia associada a baixo risco • Ausência de diabetes em familiares de primeiro grau • Ganhos de peso antes e durante a gravidez normais • Ausência de história de glicemias anormais • Ausência de intercorrências obstétricas prévias

FONTE: BUCHANAN E XIANG, 2005.

3.4.3 Diagnóstico do DMG

Em 2004, a ADA publicou seu posicionamento em relação ao diagnóstico do DMG, que foi utilizado até 2011. Recomendava-se a realização do *screening* e diagnóstico do DMG entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, e incluía dois tipos de abordagens:

a) Diagnóstico em duas etapas:

a.1) realizar um *screening* inicial avaliando a glicemia 1 hora após uma sobrecarga de 50g de glicose: glicemia \geq 140mg/dl identificava cerca de 80% das mulheres com DMG;

a.2) realizar, em dia subsequente, o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com uma sobrecarga de 100g, para o diagnóstico do DMG nas pacientes que apresentaram o teste de *screening* alterado.

b) Diagnóstico em uma etapa: realizar o TOTG com sobrecarga de 100g após jejum de 8 horas. Para o diagnóstico do DMG, pelo menos dois dos seguintes valores deveriam ser encontrados (ADA, 2010):

- Jejum ≥ 95 mg/dl
- 1h ≥ 180 mg/dl
- 2h ≥ 155 mg/dl

No entanto, sabe-se que o DMG traz riscos tanto para a mãe quanto para o feto/neonato, e estudos demonstram que a ocorrência destes eventos adversos aumenta em função da glicemia materna na 24^a-28^a semanas de gestação, mesmo dentro das faixas previamente consideradas normais para a gestação. Por este motivo, após deliberações em 2008-2009, a ADA (2012) revisou as recomendações para o diagnóstico do DMG.

Atualmente, recomenda-se que todas as gestantes realizem o TOTG com sobrecarga de 75g de glicose, após jejum de 8h, entre a 24^a- 28^a semanas de gestação, avaliando-se a glicemia de jejum e a glicemia 1h e 2h após sobrecarga. O diagnóstico de DMG é estabelecido quando qualquer um dos seguintes valores de glicemia é excedido (ADA, 2012):

- Jejum ≥ 92 mg/dl
- 1h ≥ 180 mg/dl
- 2h ≥ 153 mg/dl

As alterações nos critérios diagnósticos, que agora são mais restritivos, foram feitas com base no contexto da preocupação mundial com o aumento da incidência de obesidade e diabetes, com o intuito de otimizar os desfechos gestacionais tanto para a mãe quanto para seu bebê. Porém, a ADA (2012) reconhece que haverá um aumento significativo na incidência de DMG diagnosticados com estes novos critérios, e demonstra certa preocupação com a “medicalização” (possibilidade de intervenções desnecessárias) de gestantes previamente classificadas como normais.

Ryan (2011) menciona que os novos critérios diagnósticos propostos para o DMG vão resultar em uma prevalência de DMG de 17,8%, dobrando o número de mulheres diagnosticadas com os critérios antigos. Visser e Valk (2012) reconhecem como pontos positivos da utilização destes novos critérios o diagnóstico de maior

número de pacientes, havendo redução da ocorrência de desfechos gestacionais adversos, e o tratamento da maioria dos casos sendo relativamente mais simples, por meio de dietas. Porém, há também pontos negativos a serem considerados: a baixa reprodutibilidade do TOTG, e fatores econômicos, pois o diagnóstico do DMG representa custos, com enfermeiras, nutricionistas e clínicos, assim como com o monitoramento e terapia para o diabetes, e maiores gastos ocorrem quando diagnosticados mais casos.

Mulheres com DMG apresentam risco substancialmente elevado de desenvolver DM2 após a gestação, devendo ser reavaliadas 6 a 12 semanas após o parto, utilizando os critérios diagnósticos de TOTG para não gestantes. O diagnóstico de DM2 é feito quando a glicemia 2h após a sobrecarga de 75g de glicose for ≥ 200 mg/dL. Na maioria dos casos há reversão para tolerância normal à glicose, porém, existe um risco de 20-60% de desenvolvimento de DM2 em 5-10 anos após a gestação (ROBBITAILLE e GRANT, 2008; XIANG *et al.*, 2010; ADA, 2012).

3.4.4 Frequência do DMG

O DMG ocorre em 1 a 14% de todas as gestações. Esta ampla variação é decorrente da falta de padronização dos testes de *screening* e dos critérios diagnósticos, assim como de diferenças na distribuição genética (grupo étnico estudado) e de fatores de risco ambientais (TORLONI *et al.*, 2008). Dentre os grupos étnicos, os de maior risco são os afro-americanos, latinos, americanos nativos, americanos asiáticos e habitantes das ilhas do Pacífico (ADA, 2012).

Evidências recentes sugerem que a prevalência do DMG está em elevação, possivelmente em paralelo ao aumento da prevalência do DM2 (LAWRENCE *et al.*, 2010; GIRGIS *et al.*, 2012). Visser e Valk (2012) complementam que a incidência do DMG está elevando-se rapidamente em virtude de aumentos na obesidade e idade maternas.

De acordo com a ADA (2009), aproximadamente 7% de todas as gestações eram complicadas pelo DMG, resultando em mais de 200.000 casos anualmente. Porém, com a inclusão de novos critérios diagnósticos para o DMG será observada uma prevalência de DMG de 17,8%, dobrando o número de mulheres

diagnosticadas segundo os critérios antigos (RYAN, 2011). No Brasil, de acordo com Shaat *et al.* (2007), a prevalência de DMG era de 7,6%.

Na TABELA 5 são apresentadas as frequências do DMG em diferentes populações.

TABELA 5 - PREVALÊNCIA DO DMG EM DIFERENTES POPULAÇÕES

Países	Critério Diagnóstico	Prevalência
Nova Zelândia	Local	19,3%
Itália	Carpenter e Coustan	13,3%
Estados Unidos	NDDG	13,0%
Canadá	NDDG	12,8%
Tailândia	NDDG	10,2%
Austrália	OMS	9,5%
Brasil	OMS	7,6%
Sri Lanka	OMS	5,5%
Irã	Carpenter e Coustan	4,8%
Índia	OMS	3,8%
Etiópia	OMS	3,7%
Paquistão	Carpenter e Coustan	3,5%
Dinamarca	OMS	3,2%
Japão	Local	2,9%
China	OMS	2,3%
Coréia	NDDG	2,2%
Reino Unido	EASD	1,2%
Suíça	EASD	1,2%
Turquia	NDDG	1,2%
Taiwan	OMS	0,6%

EASD: Associação Europeia para o Estudo do Diabetes; NDDG: *National Diabetes Data Group*; OMS: Organização Mundial da Saúde.

Fonte: Adaptado de SHAAT *et al.*, 2007.

3.4.5 Complicações do DMG

O DMG é um grande problema de saúde pública, e está relacionado a complicações para a mãe e para o feto/neonato, tanto durante a gestação, quanto durante o parto (HORVATH *et al.*, 2010).

Para a mãe, o DMG está associado a traumas, pré-eclâmpsia e eclâmpsia e partos cesáreos (CHEN *et al.*, 2009).

A glicemia elevada e crônica é tóxica para o feto e contribui para embriopatias. A hiperglicemia está associada a aumento da morbimortalidade perinatal e admissão a unidades de cuidados neonatais intensivos. As complicações neonatais adversas incluem macrosomia (peso >4kg), hipocalcemia, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipomagnesemia, hipoglicemia neonatal, malformações congênitas, como a disfunção cardíaca neonatal, deslocamento de ombro e lesões ao nascimento, e natimorte (MAUAD FILHO *et al.*, 1998; SBD, 2006; ADA, 2008; ROBBITAILLE e GRANT, 2008; CHEN *et al.*, 2009).

O DMG também apresenta elevado valor preditivo para o posterior desenvolvimento de DM2, tanto para mãe, quanto para sua prole. Mulheres que desenvolvem DMG apresentam risco de 20 a 60% de desenvolver DM2 dentro de 5-10 anos após o parto, dependendo da população estudada. Já, os filhos de mães com DMG são mais propensos a apresentar sobrepeso, obesidade abdominal e desenvolver intolerância à glicose na adolescência, comparativamente a filhos de mães não diabéticas (ROBBITAILLE e GRANT, 2008; PIRKOLA *et al.*, 2010; XIANG *et al.*, 2010).

Como já mencionado, é bem estabelecido que o DMG está associado a um risco significativamente aumentado de resultados perinatais adversos. Porém, é controverso se a hiperglicemia materna menos severa que os valores de corte para diagnóstico do DMG está associada a um aumento de desfechos gestacionais adversos. Com base nisto, o objetivo do *Hapo Study Cooperative Research Group* (2008) foi esclarecer os riscos de desfechos adversos associados a graus de intolerância materna à glicose menos severos que no DMG evidente.

O estudo HAPO avaliou desfechos primários: peso ao nascer superior ao percentil 90 para a idade gestacional, parto cesáreo, hipoglicemia neonatal diagnosticada clinicamente e nível de peptídeo C sérico do cordão umbilical superior ao percentil 90 (hiperinsulinemia fetal). Desfechos secundários foram: parto prematuro (antes de 37 semanas de gestação), deslocamento de ombro ou lesões ao nascimento, necessidade de cuidados neonatais intensivos, hiperbilirrubinemia e pré-eclâmpsia (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 2008).

Dois desfechos primários neste estudo, peso ao nascer superior ao percentil 90 e níveis de peptídeo C sérico do cordão umbilical acima do percentil 90

(hiperinsulinemia fetal), foram fortemente associados à glicemia materna, e podem ser considerados como consequências fisiológicas da glicemia materna, ao invés de distúrbios reais ou problemas. Os outros dois desfechos primários (parto cesáreo e hipoglicemia neonatal diagnosticada clinicamente) e os cinco desfechos secundários (parto prematuro antes de 37 semanas de gestação, deslocamento de ombro ou lesões ao nascimento, necessidade de cuidados neonatais intensivos, hiperbilirrubinemia e pré-eclâmpsia) também mostraram associação linear com a glicemia materna, no entanto, são complicações gestacionais bem definidas em mulheres com DMG (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 2008).

Questionamentos têm sido feitos em relação aos benefícios de se tratar o DMG “leve”. Investigações recentes indicam que a hiperglicemia materna menos severa que aquela utilizada para definir o DMG está relacionada a desfechos ou problemas perinatais clinicamente importantes, e que seus efeitos podem ser reduzidos por meio de tratamento, embora o limiar glicêmico para necessidade de tratamento não esteja estabelecido (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 2008).

3.4.6 Tratamento do DMG

O diagnóstico precoce e o tratamento do DMG visam reduzir a morbimortalidade materna e fetal, além de melhorar a qualidade de vida materna pós-natal (WEINERT *et al.*, 2011).

O tratamento inclui dieta individualizada, prática de atividade física e terapia farmacológica.

A terapia nutricional é a primeira opção de tratamento, evita o ganho de peso materno excessivo, além de promover menor taxa de macrosomia e de complicações perinatais (PADILHA *et al.*, 2010; WEINERT *et al.*, 2011).

A prática de exercícios tem como benefício a redução da glicemia, do ganho de peso excessivo da mãe e a diminuição da incidência de macrosomia. Deve ser recomendada a todas as gestantes diabéticas, na ausência de contra-indicações, como trabalho de parto pré-termo, doença hipertensiva da gestação, crescimento fetal restrito, gestação múltipla (igual ou superior a trigemelar) e sangramento persistente no segundo ou terceiro trimestres (WEINERT *et al.*, 2011).

O uso de medicação é lançado se as metas glicêmicas preconizadas não forem atingidas em duas semanas por meio de dieta e atividade física. O tratamento farmacológico padrão para o DMG é a insulinoterapia subcutânea. Porém, é complexo, de maior custo, menor aceitação pelas pacientes, e, pode acarretar ganho indesejado de peso. Como alternativa terapêutica, medicações orais mostraram-se de efetividade comparável à da insulina. Salienta-se que as diretrizes divergem sobre o tratamento farmacológico do DMG. A SBD sugere o uso de insulina como tratamento padrão. Já, o *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) recomenda o uso de metformina, e a *International Diabetes Federation* (IDF) sugere tanto a metformina, quanto a glibenclamida como opções de tratamento (PONTES *et al.*, 2010; WEINERT *et al.*, 2011).

3.5 GENES NO DMG

Estudos genéticos sobre o DM2 sugerem que se trata de uma patologia poligênica, na qual variantes em múltiplos genes interagem com fatores ambientais para causar a doença. Pelo fato da íntima correlação entre DMG e DM2, é provável que o DMG seja também uma patologia poligênica. Portanto, os estudos a respeito da etiologia do DMG iniciaram-se avaliando variantes dos genes que predisõem ao DM2 (ROBBITAILLE e GRANT, 2008).

Lauenborg *et al.* (2009) complementam que vários estudos genéticos sobre a patogênese do DM2 têm sido conduzidos, sendo identificadas variantes em regiões genômicas associadas à função prejudicada de células β , resistência à insulina e obesidade, e que estes traços variantes são também encontrados em mulheres com DMG corrente ou prévia.

Dentre os genes em estudo, estão incluídos:

- Genes de secreção da insulina: *KCNJ11* (*Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11*), *UCP2* (*Uncoupling protein-2*), *ND1* (*Mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1*) e *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*).
- Genes da insulina e de sinalização da insulina: *INS* (*Insulin*), *INSR* (*Insulin receptor*), *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*) e *IRS1* (*Insulin receptor substrate 1*).

- Genes do metabolismo de lipídeos e glicose: *PPARG* (*Peroxisome proliferative activated receptor-gamma*), *PPARGC1A* (*Peroxisome proliferative activated receptor-gamma coactivator 1-alpha*), *ADRB3* (β -3 adrenergic receptor), *GLUT1* (*Glucose transporter 1*), *ADIPOQ* (*Adiponectin*) e *FOXC2* (*Forkhead box C2*).
- Genes *MODY* (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*): *GCK* (*MODY2*), *HNF4A* (*MODY1*), *HNF1A* (*MODY3*), *IPF1* (*MODY4*), *HNF1B* (*MODY5*) e *NEUROD1* (*MODY6*).
- Outros genes: *MBL2* (*Mannose-binding lectin protein C*), *CAPN10* (*Calpain 10*) e *PAI-1* (*Plasminogen activator inhibitor type 1*) (ROBBITAILLE e GRANT, 2008).
- Gene associado à obesidade: *FTO* (*Fat Mass and Obesity Associated*) (LIMA *et al.*, 2010).

Neste trabalho foram estudados polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*, *single nucleotide polymorphisms*) de dois genes: gene *FTO* e gene *TCF7L2* e sua associação ao DMG.

Polimorfismos de nucleotídeo único são alterações genômicas onde uma base nitrogenada está modificada. Podem ocorrer em éxons, íntrons e sequências regulatórias do genoma. São alterações comuns do genoma, que ocorrem aproximadamente a cada 100 a 300 bases, porém, menos de 1% dos *SNPs* provocam alterações do produto gênico (LÉDA, 2010).

3.6 GENE *FTO* (*Fat Mass and Obesity Associated gene*; gene associado à massa adiposa e obesidade)

3.6.1 Nomenclatura

O gene *FTO* foi descoberto em camundongos e recebeu a designação de *FT* (*Fused Toes*), pelo fato dos mesmos apresentarem os dedos unidos. Posteriormente, o gene foi clonado e caracterizado como um gene de grande tamanho, que expressa uma proteína com 502 aminoácidos, sendo assim, denominado *FATSO* (“gordinho”) e abreviado como *FTO*. Com a verificação de sua associação ao acúmulo excessivo de gordura corporal, o *Gene Nomenclature Committee da Human Genome*

Organisation substituiu o nome do gene de *FTO* para *Fat Mass and Obesity Associated* (gene associado à massa adiposa e à obesidade, em tradução livre), porém manteve a sigla *FTO* (LIMA *et al.*, 2010).

3.6.2 Localização

Localiza-se no braço longo (q) do cromossomo 16, na posição 12.2 (FIGURA 1). Possui 9 exons e 8 introns (FIGURA 2), que ocupam mais de 400.000 pares de bases. Todos os *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*) identificados até o momento localizam-se no primeiro e maior intron do gene, uma região cuja sequência é altamente conservada entre as espécies. O *FTO* é encontrado somente em vertebrados e algas marinhas, estando ausente em todos os invertebrados, fungos e bactérias (CHEUNG e YEO, 2011; JACOBSSON *et al.*, 2012).

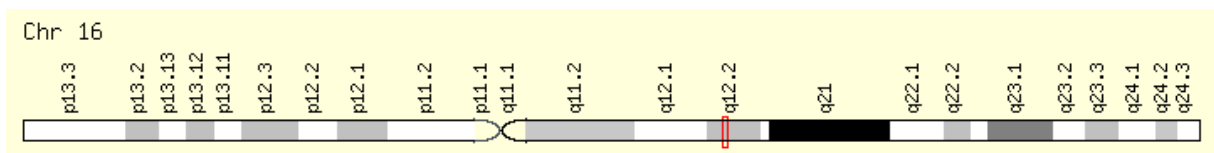


FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO DO GENE FTO NO CROMOSSOMO 16

A marcação na figura indica o braço longo (q) do cromossomo 16, na posição 12.2.

Fonte: www.genecards.org

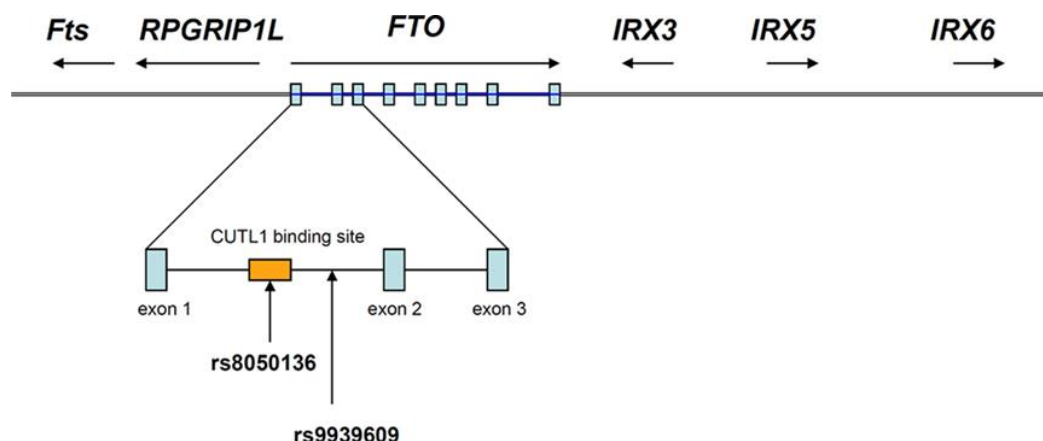


FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO *FTO* E SEUS GENES ADJACENTES

O gene *FTO* apresenta 9 exons (caixas) e 8 introns. Em destaque na parte inferior da figura a localização dos SNPs em estudo.

Fonte: CHEUNG e YEO, 2011.

3.6.3 Função e expressão tecidual do gene *FTO*

A exata função do gene *FTO* não é conhecida. Investigações em ratos sugerem que ele possa estar envolvido na demetilação, remoção de grupos metila ($-CH_3$), de ácidos nucleicos, e que as concentrações de seu RNA mensageiro são reguladas por alimentação e jejum. Mutações neste gene estão associadas a retardo no crescimento e desenvolvimento, face grosseira e morte precoce (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Investigações de Li *et al.* (2008) e Hotta *et al.* (2008) forneceram evidências de que vários polimorfismos do gene *FTO* estavam significativamente associados à obesidade em populações de origem europeia. Porém, o mecanismo preciso, por meio do qual o gene *FTO* está associado ao desenvolvimento da obesidade não é claro. No entanto, os autores salientam que este gene é expresso no hipotálamo e regulado pelo jejum e pela leptina, que é um hormônio sintetizado e secretado na circulação principalmente pelos adipócitos. O *FTO* exerce controle regulatório na ingestão alimentar e no gasto energético, por meio de múltiplas ações centrais e periféricas. Na obesidade, a existência de um mecanismo endógeno de resistência à leptina, limitando seu efeito regulatório, pode explicar a forte correlação entre concentrações de leptina sérica e massa adiposa (LABAYEN *et al.*, 2011).

Peng *et al.* (2011) ressaltaram que o gene *FTO* é expresso principalmente no hipotálamo e codifica uma demetilase de ácidos nucleicos dependente de 2-

oxoglutarato. O *FTO* parece ter função importante na manutenção da homeostase da energia, demetilação de ácidos graxos e regulação da massa adiposa pela lipólise. Yeo (2011) e Jacobsson *et al.* (2012) complementaram que o *FTO* pertence à família de enzimas dioxigenases, que estão envolvidas em muitos processos celulares, incluindo reparo de DNA e RNA. *In vitro*, o *FTO* é capaz de remover lesões metil de fitas simples de DNA e RNA, sugerindo que o papel fisiológico do *FTO* poderia estar ligado a modificações de ácidos nucleicos. No entanto, não se sabe como esta atividade de demetilação possa estar ligada à obesidade.

Cheung e Yeo (2011) e Lima *et al.* (2011) salientaram que o *FTO* é amplamente expresso em tecidos fetais e adultos de humanos, com a expressão mais elevada no cérebro, nos diferentes núcleos hipotalâmicos (arqueado, paraventricular, dorsomedial e ventromedial), onde o controle da homeostasia energética está centralizado. Isto aponta um possível papel do gene no controle da homeostase energética, com o produto do *FTO* atuando como regulador primário do acúmulo de gordura corporal. Expressão significativa também foi observada no tecido adiposo, pâncreas, fígado, musculatura esquelética estriada e cardíaca, rins e gônadas.

De acordo com Yeo (2011) e Yeo e O'Rahilly (2012), o jejum reduz os níveis de expressão do *FTO* no núcleo arqueado do hipotálamo, enquanto dietas ricas em gordura aumentam seus níveis. Com base nisto, redução da expressão do *FTO* no núcleo arqueado aumenta a ingestão alimentar, enquanto uma expressão exacerbada do *FTO* reduz a ingestão alimentar (FIGURA 3). Portanto, o *FTO* pode influenciar a homeostase energética por apresentar efeito direto na ingestão alimentar.

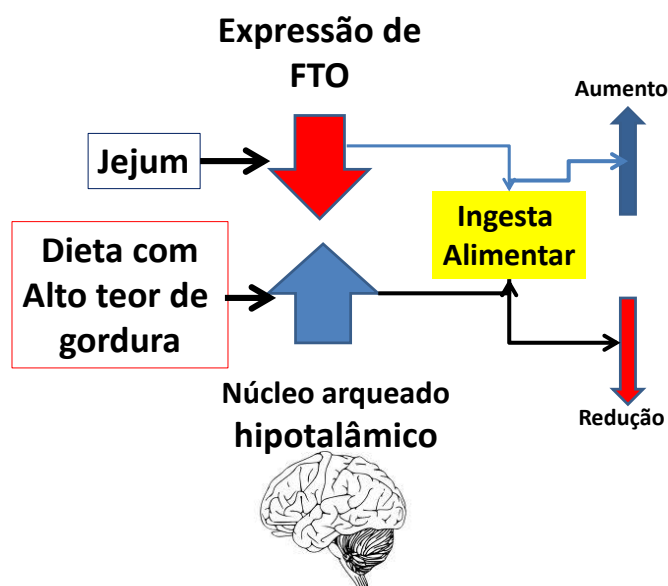


FIGURA 3 – INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA EXPRESSÃO DO GENE *FTO*

O jejum e dietas ricas em gordura, respectivamente, reduzem e aumentam a expressão do *FTO* no núcleo arqueado do hipotálamo. A redução da expressão do *FTO* no núcleo arqueado está associada ao aumento da ingestão alimentar, enquanto uma expressão exacerbada do *FTO* reduz a ingestão alimentar.

Fonte: Adaptado de YEO, 2011.

3.6.4 Polimorfismos selecionados para estudo

Dentre os genes ligados à obesidade, polimorfismos no gene *FTO* estão fortemente associados ao aumento da gordura corporal em diferentes populações (LABAYEN *et al.*, 2011). O gene *FTO* permanece sendo a mais intensa associação de qualquer polimorfismo genético com a obesidade (LARDER *et al.*, 2011). Estudos também salientam que a obesidade relacionada aos alelos de risco do gene *FTO* pode predispor os indivíduos ao DM, hipertensão e eventos cardiovasculares (AHMAD *et al.*, 2010).

Para o presente estudo, foram selecionados os *SNPs* rs9939609 e rs8050136. O *SNP* rs8050136 localiza-se no intron1 do gene *FTO*, e é constituído pelos alelos A e C, sendo A o alelo de risco. O *SNP* rs9939609 contempla os alelos: A (alelo de risco) e T (LIMA *et al.*, 2010).

3.6.5 Estudos de associação com os *SNPs* rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO*

Field *et al.* (2007) analisaram o *SNP* rs9939609 do gene *FTO* em um grupo composto por 14.803 indivíduos ingleses, incluindo portadores de DM1 e controles saudáveis. Neste estudo os autores verificaram que o polimorfismo rs9939609, que aumenta o risco de obesidade infantil e DM2, não alterou a suscetibilidade ao DM1 na população inglesa. Os autores salientam que seus resultados indicam que o ganho de peso mediado pelo gene *FTO* não predispõe indivíduos ao DM1, como o faz para o DM2.

Também em 2007, Frayling *et al.* (2007) citam que *SNPs* na região do gene *FTO*, mais especificamente o *SNP* rs9939609, está fortemente associado ao DM2. Os autores ainda salientam que, em estudos conduzidos com populações adultas, alelos de risco para o DM2 (alelo A do polimorfismo rs9939609) apresentam associação a elevações do índice de massa corporal (IMC). Ou seja, indivíduos homozigotos para o alelo A do polimorfismo rs9939609 apresentam risco substancialmente mais elevado de sobrepeso ou obesidade quando comparados aos homozigotos para o alelo T de baixo risco. Os autores concluem, portanto, que o polimorfismo rs9939609 está associado a alterações no IMC e à obesidade.

No ano seguinte, Li *et al.* (2008) avaliaram a associação de três polimorfismos do gene *FTO* (rs8050136, rs9939609 e rs9930506) à obesidade e ao DM2, em uma população constituída por 3.210 chineses Han. As frequências dos alelos de risco dos polimorfismos rs8050136, rs9939609 e rs9930506 nesta população foram substancialmente mais baixas que as observadas para populações de descendência europeia. Os resultados demonstraram que nenhum dos *SNPs* do gene *FTO* apresentou associação com obesidade, sobrepeso, IMC, circunferência abdominal e porcentagem de gordura corporal. Também, nenhum dos *SNPs* exibiu associação significativa com valores de glicemia de jejum, hemoglobina A1C, insulina e função das células β . Os autores concluem, portanto, que as variantes do gene *FTO* não são contribuintes importantes para a obesidade e DM2 na população chinesa Han.

Para investigar a relação entre o gene *FTO* e obesidade em japoneses, Hotta *et al.* (2008) genotiparam *SNPs* do gene *FTO* de indivíduos obesos ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$) e controles normais ($\text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$). A análise revelou que 15 *SNPs* demonstraram associações com obesidade, sendo o polimorfismo rs1558902 o mais significativamente associado à obesidade severa na população japonesa. O estudo também demonstrou que fenótipos associados à obesidade, como glicose

plasmática, hemoglobina A1C, colesterol total, triglicérides, HDL-colesterol e pressão arterial não apresentaram associação ao polimorfismo rs1558902.

Estudos com populações oceânicas, afro-americanas, chinesas Han e japonesas não mostraram associação entre o *SNP* rs9939609 e obesidade. Há evidências emergentes que outros *SNPs*, que não estejam em desequilíbrio de ligação com o rs9939609, possam ser a variante causal em populações não europeias (CHANG *et al.*, 2008).

A associação do gene *FTO* com a obesidade é robusta em populações de descendência europeia. Os únicos estudos negativos publicados envolveram populações não europeias. Evidências sugerem que o polimorfismo rs9939609 possa estar em desequilíbrio de ligação com uma variante causal em populações de descendência europeia, mas que este desequilíbrio não ocorre em outros grupos étnicos, como afro-descendentes (CECIL *et al.*, 2008).

Ainda segundo Cecil *et al.* (2008), variantes do gene *FTO* parecem conferir risco à obesidade por meio da ingestão calórica aumentada, sugerindo que a restrição da ingestão energética pode prevenir a obesidade associada ao gene *FTO*. Este achado e suas implicações são especialmente importantes, dado o consenso que a obesidade na infância é um preditor importante da morbi-mortalidade cardiovascular na vida adulta.

Evidências demonstram uma associação entre a resposta pós-prandial à saciedade e o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*, com os genótipos TA/AA predispondo os indivíduos a uma resposta pós-prandial reduzida à saciedade (DEN HOED *et al.*, 2009).

Den Hoed *et al.* (2009) também salientam que o papel fisiológico por meio do qual variantes no gene *FTO* influenciam o risco de desenvolver obesidade ainda não foi estabelecido. Estudos recentes têm demonstrado que o gene *FTO* é altamente expresso no tecido adiposo e áreas do hipotálamo que estão envolvidas na regulação da ingestão de alimentos, como os núcleos arqueado, paraventricular, dorsomedial e ventromedial. Isto sugere que o gene *FTO* pode influenciar a adiposidade por afetar o apetite. Estudos demonstram que a ingestão alimentar é maior em crianças portadoras dos genótipos TA/AA do polimorfismo rs9939609, em comparação às portadoras do genótipo TT. Também foi demonstrado que crianças de 8 a 11 anos portadoras dos genótipos TA/AA apresentam menor resposta à

saciedade, aumentando o risco de alimentação excessiva e desenvolvimento de obesidade.

Em 2010, Liu *et al.* (2010) analisaram dois polimorfismos (rs9939609 e rs8050136) do gene *FTO* em 4.189 chineses Han, e conduziram uma meta-análise dos estudos publicados para investigar se os polimorfismos apresentam associação ao DM2 e obesidade nesta população. No estudo, o alelo de risco A do polimorfismo rs9939609, assim como o alelo de risco A do polimorfismo rs8050136, estavam associados a um risco aumentado de DM2 e obesidade, mas não apresentaram associação ao sobrepeso. Os autores concluem que os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO* contribuem para obesidade e DM2 nas populações asiáticas.

Liu *et al.* (2010) também replicaram, em amostra composta por adolescentes, uma associação significativa entre a variante rs9939609 do gene *FTO* e IMC, peso e circunferência abdominal. Não observaram nenhuma associação significativa entre o *SNP* rs9939609 e ingestão calórica ou atividade física.

Com relação ao *SNP* rs8050136, Ahmed *et al.* (2010) demonstraram forte associação do alelo de risco A com o IMC. Indivíduos homozigotos AA apresentaram uma média de IMC que foi 1,0 kg/m² maior que nos homozigotos CC. O alelo de risco também estava associado a níveis baixos de HDL-colesterol, níveis mais elevados de proteína C reativa, e maior prevalência de hipertensão, DM e síndrome metabólica.

De acordo com Lima *et al.* (2010), ao pesquisar sobre a ação do gene *FTO* no desenvolvimento do DM2, Frayling *et al.* (2007) encontraram, para indivíduos homozigotos para o alelo A do *SNP* rs9939609, uma chance 1,3 vezes maior de manifestar a patologia. No entanto, após ajuste estatístico para o IMC, a associação entre o DM2 e o *FTO* foi eliminada, sugerindo que esta era mediada pelo sobrepeso ou obesidade.

Ainda a respeito do *SNP* rs9939609, indivíduos caucasoides, comparativamente a não caucasoides, portadores do genótipo AA, apresentam resposta reduzida à saciedade, apresentando maior propensão ao acúmulo de gordura corporal. Homozigotos A fazem escolhas alimentares menos saudáveis que os demais. Isto indica uma provável ação hiperfágica do gene, ou seja, desenvolve-se uma postura de consumir preferencialmente alimentos com alta densidade energética. A maior facilidade para o acúmulo de gordura corporal dos homozigotos

para o alelo A, associada à redução na percepção da saciedade, podem ser facilitadores da instalação de comorbidades concomitantemente à obesidade, como o DM2, alteração aterogênica identificada pelo perfil lipídico sérico e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LIMA *et al.*, 2010).

Lima *et al.* (2010) ainda ressaltaram que não se sabe como o alelo A influencia o maior acúmulo de gordura. Em virtude de sua elevada expressão no hipotálamo, região intimamente ligada ao controle do apetite e acúmulo de gordura corporal, se presume que ocorra estímulo desta região, com o objetivo de poupar estoques de gordura, o que pode ocorrer por meio da diminuição da saciedade e/ou do aumento da capacidade de captação de gordura pelos adipócitos.

Segundo Larder *et al.* (2011), o gene *FTO* é expresso na placenta e está associado a elevações no peso e tamanho dos bebês, indicando que alguns dos efeitos *exutero* observados podem ser, em parte, resultados de um fator pré-natal.

Kaklamani *et al.* (2011) demonstraram em seu estudo uma expressão significativa do gene *FTO* em tecido mamário normal e canceroso, e verificaram que os *SNPs* do intron1 estão significativamente associados ao risco de câncer de mama.

Labayen *et al.* (2011) verificaram que o alelo de risco A do *SNP* rs9939609 estava significativamente associado a concentrações mais elevadas de leptina sérica. Este achado associa o gene *FTO* à leptina sérica, e, conseqüentemente, ao controle do balanço energético.

Cheung e Yeo (2011) salientaram que em 2007, estudos de associação com o DM2 identificaram múltiplos *SNPs* no intron 1 do gene *FTO* associados à patologia. No entanto, a associação entre estes *SNPs* e o DM2 desapareceu após ajuste em relação ao IMC, sugerindo que estes *SNPs* estavam associados ao IMC, com o peso elevado, sendo um risco para DM2. Confirmação desta associação com o IMC foi replicada em outros 13 estudos, incluindo um total de 38.759 indivíduos, sugerindo que este *SNP* predispõe ao DM2 por meio de um efeito na massa corporal.

Apesar de estudos demonstrarem que a associação entre o gene *FTO* e o DM é mediada pelo IMC, investigações recentes mostraram que em certas populações o gene *FTO* aumenta a suscetibilidade ao DM2 independente do efeito no ganho de peso, sugerindo que variações no ambiente ou outros fatores genéticos possam

contribuir para a associação diferencial observada entre grupos étnicos (LARDER *et al.*, 2011).

O *SNP* rs9939609 apresenta o mais forte efeito conhecido na elevação do IMC, particularmente em populações europeias. Indivíduos homozigotos para o alelo de risco A pesam aproximadamente 3kg a mais, e apresentam um risco 1,67 vezes maior de desenvolver obesidade em relação aos homozigotos TT não portadores do alelo de risco. Já, portadores heterozigotos apresentam um ganho de peso intermediário de 1,5kg (CHEUNG e YEO, 2011; LARDER *et al.*, 2011).

A associação entre o *SNP* rs9939609 e IMC aumentado/obesidade foi replicada e confirmada tanto em adultos quanto em crianças, de múltiplos grupos étnicos. No entanto, a frequência do alelo de risco A é diferente entre os grupos étnicos, sendo próxima a 60% na maioria das populações europeias, comparada a somente 17% em algumas populações asiáticas. Apesar da variação na frequência, o efeito de elevação de 3 kg no peso corporal permanece consistente, independente da etnia (CHEUNG e YEO, 2011).

Cheung e Yeo (2011) salientaram também que, com uma estimativa de 1 bilhão de portadores homozigotos dos alelos de risco, o gene *FTO* claramente influencia de alguma forma o peso corporal de uma proporção significativa da população mundial.

Como a regulação do peso corporal é decorrente de um balanço entre a ingestão e o gasto de energia, vários estudos têm avaliado a influência de variantes do gene *FTO* no apetite, ingestão alimentar e gasto energético. Indivíduos homozigotos para o alelo de risco A do *SNP* rs9939609 comem significativamente mais, apresentam saciedade reduzida, têm preferência por alimentos altamente calóricos, especialmente aqueles com elevado conteúdo de gordura, e apresentam maior massa adiposa, comparativamente aos homozigotos para o alelo T (CHEUNG e YEO, 2011; LARDER *et al.*, 2011).

Ainda de acordo com Cheung e Yeo (2011) e Larder *et al.* (2011), os alelos de risco do gene *FTO* estão associados de forma inequívoca ao consumo alimentar aumentado. Já, com relação a sua associação a um possível gasto energético aumentado, assim como à frequência de prática de atividade física, os resultados dos estudos realizados são conflitantes, alguns demonstrando associação, outros não.

Xi *et al.* (2011) conduziram uma meta-análise para avaliar associação dos polimorfismos rs9939609 e rs8050136 com obesidade e DM2 em uma população do leste asiático. Verificaram que tais polimorfismos estão associados tanto à obesidade quanto ao DM2 nesta população.

Woehning *et al.* (2012) avaliaram uma possível interferência do genótipo AA do polimorfismo rs9939609 na estabilização do peso corporal após terapia dietética para perda de peso. No início do estudo, portadores AA apresentaram peso corporal significativamente mais elevado que portadores TT. Após intervenção, os portadores AA tiveram uma perda de peso significativamente menor que os portadores TT. E, entre os indivíduos que sofreram novo ganho de peso após a terapia, houve maior número de portadores do genótipo AA. Portanto, deve-se enfatizar os programas de redução de peso para os portadores do genótipo AA.

A síndrome metabólica está fortemente associada ao risco de DM2. No estudo de Zhou *et al.* (2012), foi observada associação positiva do polimorfismo rs9939609 com o risco de síndrome metabólica (caracterizada por obesidade central, hipertensão, hipertrigliceridemia, HDL-colesterol baixo, glicemia elevada e microalbuminúria) em populações europeias e asiáticas.

O mecanismo pelo qual o polimorfismo rs9939609 influencia a síndrome metabólica não é claro. O gene *FTO* é altamente expresso no cérebro, particularmente no hipotálamo, sugerindo que exerça um papel importante na ingestão calórica e na modulação da pressão sanguínea. Vários estudos sugerem que indivíduos obesos portadores de mais de um alelo de risco (A) do polimorfismo rs9939609 estão propensos a uma ingestão alimentar aumentada e perda do controle alimentar, comparados aos não portadores do alelo de risco. Além disto, estudos com crianças mostraram que a variante do gene *FTO* estava envolvida na escolha alimentar, sendo portadores do alelo de risco mais propensos a escolher alimentos de alta densidade calórica. O alelo de risco do polimorfismo rs9939609 também estava associado a outros componentes da síndrome metabólica, como insulina, glicose e triglicérides elevados, e HDL-colesterol reduzido (ZHOU *et al.*, 2012).

Wang *et al.* (2012) confirmaram forte associação dos *SNPs* rs9939609, rs8050136 e rs10421085 com a síndrome metabólica por meio de meta-análises. Estes resultados fornecem evidências atuais de que o gene *FTO* exerce papel crítico

no desenvolvimento da síndrome metabólica, e o estudo deste gene pode fornecer novas estratégias terapêuticas para prevenção e tratamento desta patologia.

O gene *FTO* promove alterações no IMC tanto na infância quanto na idade adulta. No entanto, seu efeito na idade de ocorrência do sobrepeso em adultos não é conhecido. Mei *et al.* (2012) conduziram um estudo para avaliar o efeito do *SNP* rs9939609 na idade de ocorrência de sobrepeso. Foi estimado que os genótipos AA, AT e TT apresentaram idades de ocorrência de sobrepeso de 22,82, 28,96 e 27,76 anos, respectivamente. Os genótipos AA, AT e TT apontaram probabilidade de sobrevida em indivíduos com sobrepeso de 65,8, 78,7 e 76,8%, respectivamente, aos 18 anos, e 6,5, 11,8 e 10,7% aos 60 anos. Conclui-se que as variantes genéticas de risco (A) do polimorfismo rs9939609 do gene *FTO* podem acelerar a idade de ocorrência de sobrepeso e a menor sobrevida de adultos com sobrepeso.

Em seu estudo, Ramos *et al.* (2012), confirmaram a associação do *SNP* rs9939609 com o IMC em uma população de brasileiros de ancestralidade multiétnica. A população obesa homozigota para o alelo de risco (AA) pesou 3,1 kg a mais, e apresentou IMC 1,3 kg/m² mais elevado que os homozigotos portadores do alelo protetor (TT). Os autores salientam que não encontraram evidências de associação do polimorfismo estudado com o DM2 e fenótipos relacionados à obesidade.

Lappalainen *et al.* (2012) investigaram a associação entre o *SNP* rs9939609 e a ingestão dietética em uma população finlandesa. Verificaram um IMC mais elevado nos portadores do genótipo de risco (AA), especialmente naqueles que reportavam uma dieta rica em gorduras, pobre em carboidratos e fibras. Estes achados sugerem que a associação entre os genótipos do gene *FTO* e a obesidade é influenciada também pelos componentes da ingestão dietética, e recomendações dietéticas são particularmente benéficas para indivíduos geneticamente suscetíveis à obesidade.

Já, Schum *et al.* (2012) apresentam resultados conflitantes aos de Lappalainen *et al.* (2012). Em sua investigação sobre o impacto de variantes do gene *FTO* (rs1421085, rs17817449 e rs9939609) em crianças alemãs obesas antes e após intervenções no estilo de vida (atividade física e terapia nutricional), não verificaram diferenças significativas no IMC, composição corporal e perfil metabólico (insulina, lipídeos e função hepática), comparando-se portadores homozigotos e heterozigotos dos alelos de risco dos *SNPs* avaliados.

Binh *et al.* (2012) avaliaram a associação do polimorfismo rs9939609 como risco de DM2 em uma população vietnamita. Verificaram, após ajustes para sexo, idade, pressão arterial sistólica, condições socioeconômicas, estilo de vida, IMC, relação cintura-quadril e porcentagem de gordura corporal, aumento do risco de DM2 nos portadores do alelo de risco A. Ou seja, o polimorfismo rs9939609 estava significativamente associado ao risco aumentado de DM2, independente de características relacionada à obesidade.

Ekelund *et al.* (2012) examinaram se variantes genéticas que predisõem ao DM2 podem prever o desenvolvimento de DM2 após DMG em uma população da Suécia. Após ajustes para idade e etnia, verificaram que os polimorfismos rs7903146 (gene *TCF7L2*) e rs8050136 (gene *FTO*) foram capazes de prever o DM2 após DMG. No entanto, salientaram que estudos adicionais, em outras populações, são necessários para confirmação dos resultados.

O gene *FTO* exerce importante papel no sistema nervoso central, influenciando a ingestão energética, saciedade e compulsão alimentar. Além dos efeitos centrais na regulação energética, o *FTO* também influencia diretamente o metabolismo do tecido adiposo. Isto se dá por meio da regulação da lipólise, visto que indivíduos portadores dos alelos de risco apresentam atividade lipolítica basal mais baixa nas células do tecido adiposo, comparados aos não portadores dos alelos de risco. Estudos também revelaram que os polimorfismos do gene *FTO* estão associados à redução do volume do lobo frontal, redução da *performance* cognitiva e podem aumentar o risco de demência (JACOBSSON *et al.*, 2012).

3.7 GENE *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*; gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2)

3.7.1 Localização

O gene *TCF7L2* localiza-se no braço longo (q) do cromossomo 10, na posição 25.3 (FIGURA 4). Possui 14 exons e 13 introns (FIGURA 5), que ocupam 215.863 pares de bases (TONG *et al.*, 2009).

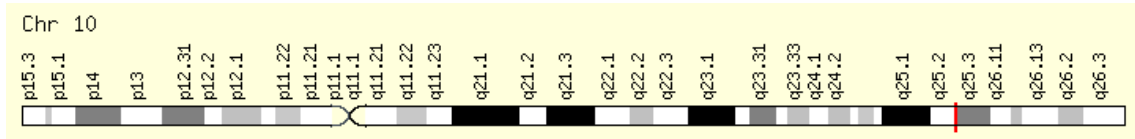


FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *TCF7L2* NO CROMOSSOMO 10

A marcação na figura indica a posição 25.3 do braço longo (q) do cromossomo 10.

Fonte: www.genecards.org

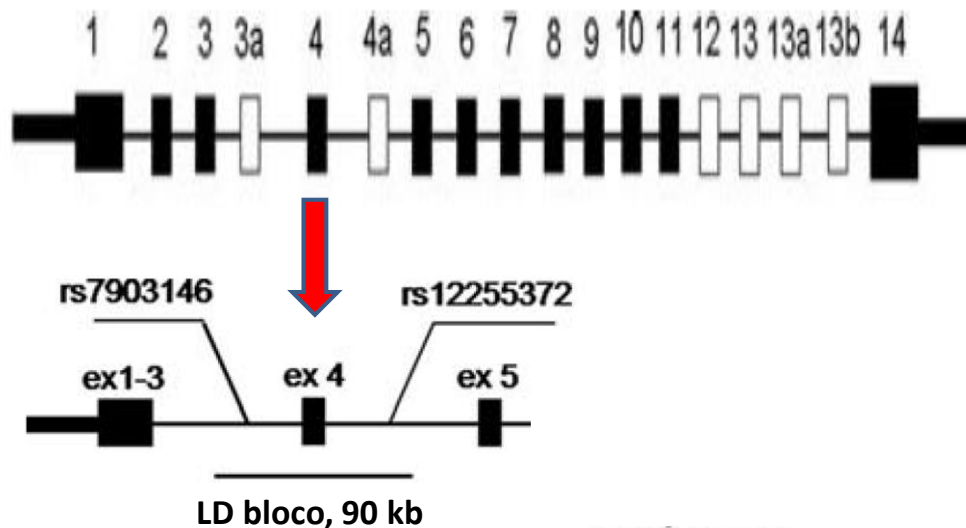


FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *TCF7L2* COM DESTAQUE PARA O SÍTIO DE LOCALIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

As caixas representam os exons. A região polimórfica em estudo está em sítio de desequilíbrio de ligação (LD).

Fonte: PROKUNINA-OLSSON *et al.*, 2009.

3.7.2 Função e expressão tecidual

O *TCF7L2* é expresso em vários tecidos, incluindo o intestino e pâncreas, e está envolvido na cascata de sinalização *Wnt*, termo que provém da combinação de *Wg* (*wingless*) e *INT*, genes que codificam proteínas de integração (CORNELIS *et al.*, 2009; MARQUEZINE, 2009). Segundo Mota *et al.* (2012), o *TCF7L2* codifica o *TCF4* (fator de transcrição 4), um fator de transcrição envolvido na via de sinalização

Wnt/ β -catenina, e desempenha papel crítico na embriogênese e no controle da proliferação e diferenciação celular.

As *Wnts* são glicoproteínas secretadas por diferentes células, que se ligam a receptores de superfície celular chamados *FZD* (anteriormente denominados *Frizzled*) e *LRP* (*Lipoprotein-Related Protein*), prevenindo a degradação da β -catenina pela *GSK3B* (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*), aumentando seus níveis intracelulares. Ou seja, na ausência de secreção de *Wnts*, a β -catenina é rapidamente fosforilada pela *GSK3B* e degradada. Na presença de *Wnts*, os níveis de β -catenina se elevam, e esta se liga a receptores nucleares *TCF7L2*, havendo a subsequente ativação de diferentes genes e proteínas envolvidos na proliferação e diferenciação celular, assim como na expressão e secreção de *GLP-1* (*Glucagon-Like Peptide-1*) como mostrado na FIGURA 6 (SMITH, 2007; MOTA *et al.*, 2012; NAIDU *et al.*, 2012).

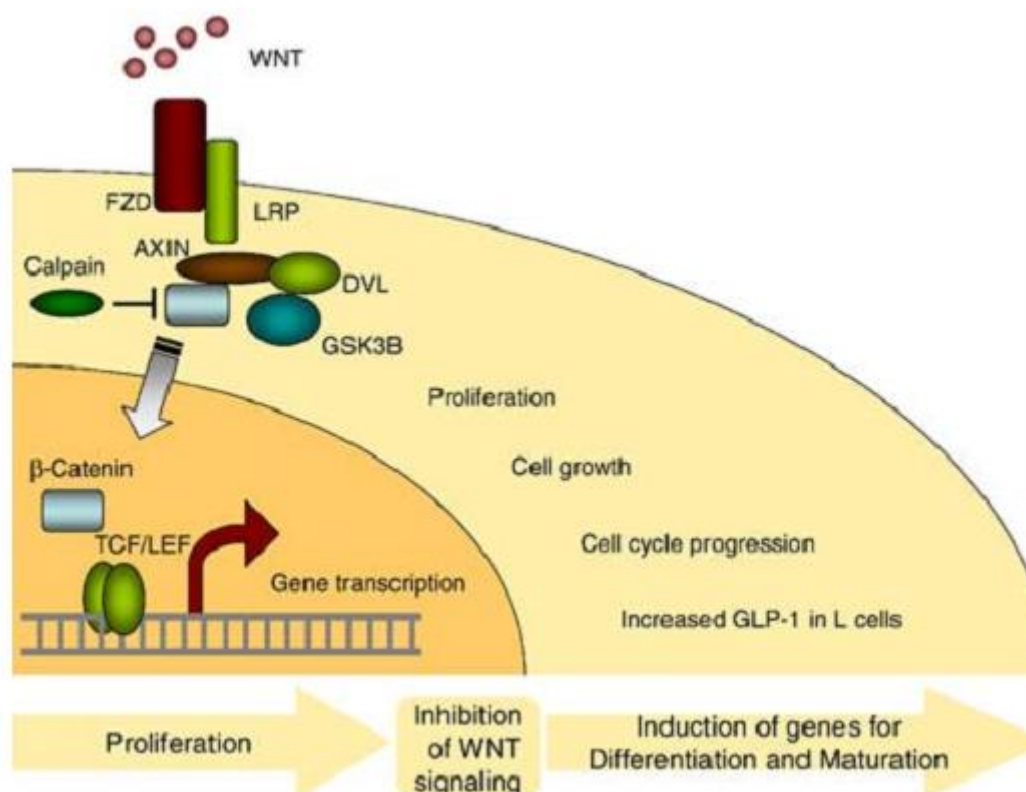


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA CASCATA DE SINALIZAÇÃO CANÔNICA WNT

As *Wnts* são glicoproteínas secretadas por diferentes células, que se ligam a receptores de superfície celular chamados *FZD* e *LRP*, prevenindo a degradação da β -catenina pela *GSK3B*, aumentando seus níveis intracelulares. Ou seja, na ausência de secreção de *Wnts*, a β -catenina é rapidamente fosforilada pela *GSK3B* e degradada. Na presença de *Wnts*, os níveis de β -catenina se elevam, e esta se liga a receptores nucleares *TCF7L2*, havendo a subsequente ativação de diferentes genes e proteínas envolvidos na proliferação e diferenciação celular, assim como na expressão e secreção de *GLP-1*.

Fonte: SMITH, 2007.

O papel do gene *TCF7L2* na patogênese do diabetes não está bem elucidado, mas ligações entre a via de sinalização *Wnt* e a secreção de insulina e proliferação de células beta têm sido sugeridas (ROBITAILLE e GRANT, 2008; OSMARK *et al.*, 2009).

Há vários mecanismos propostos para o envolvimento da sinalização *Wnt* na secreção e ação da insulina, assim como na maturação e diferenciação celular. Acredita-se que a cascata *Wnt*, por meio do receptor nuclear *TCF7L2*, seja crítica para a secreção do *GLP-1* pelas células endócrinas intestinais L. Uma alteração nesta cascata poderia levar a uma secreção reduzida de *GLP-1*, que poderia ter consequências para a secreção de insulina após uma refeição e para a geração de novas células beta (ELBEIN *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2007; SMITH, 2007).

Raitakari *et al.* (2007) complementam que o produto do gene *TCF7L2* é o fator de transcrição 4 (*TCF4*) de células T humanas, que atua na cascata de sinalização *Wnt*. Este fator de transcrição regula a transcrição do gene pró-glucagon nas células enteroendócrinas, gene que codifica o hormônio insulínico *glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in vitro*. *GLP-1* exerce efeitos na homeostase da glicose, podendo diminuir os níveis de glicose por meio do estímulo da síntese e secreção da insulina, inibição da liberação do glucagon e do esvaziamento gástrico. Estes autores salientaram ainda que o gene *TCF7L2*, sendo um membro da cascata de sinalização *Wnt*, também exerce função na regulação da adipogênese, ou seja, uma sinalização *Wnt* aumentada em portadores de variantes de risco do gene *TCF7L2* poderia influenciar potencialmente o desenvolvimento do tecido adiposo.

3.7.3 Polimorfismos selecionados para estudo

O *TCF7L2* é um gene com associação muito forte ao DM2 (DABELCA *et al.*, 2011). Foi relatado um risco 1,53 e 1,32 vezes maior para o desenvolvimento de DM2, para cada cópia do alelo de risco T do polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2*, para homens e mulheres, respectivamente (CORNELIS *et al.*, 2009).

Para o presente estudo, foram selecionados os *SNPs* *rs7903146* e *rs12255372*. O *SNP* *rs7903146* localiza-se no intron3 do gene *TCF7L2*, e é constituído pelos alelos: C e T, sendo T o alelo de risco. O *SNP* *rs12255372* localiza-se no intron4, sendo constituído pelos alelos: G e T, sendo último o alelo de risco (TONG *et al.*, 2009; PROKUNINA-OLSSON *et al.*, 2009).

3.7.4 Estudos já conduzidos com *SNPs* para o gene *TCF7L2*

Saxena *et al.* (2006) genotiparam 13 *SNPs* ao longo do gene *TCF7L2* em 8.310 indivíduos da Escandinávia, Polónia e Estados Unidos. Os resultados confirmam a associação do alelo T do polimorfismo *rs7903146* ao risco aumentado de DM2, e sugerem que as variantes do gene *TCF7L2* aumentam o risco de desenvolvimento de DM2 por interferirem na secreção de insulina.

Também em 2006, Groves *et al.* (2006) conduziram um estudo do tipo caso-controle no Reino Unido, envolvendo 2.158 pacientes com DM2 e 2574 controles saudáveis. Neste estudo foram avaliados quatro *SNPs* (*rs4506565*, *rs7903146*,

rs12243326 e rs12255372). Com base nos resultados, todos os *SNPs* estudados apresentaram ligação ao DM2, porém a associação mais forte foi relacionada ao *SNP* rs7903146.

Florez *et al.* (2006) avaliaram os polimorfismos rs12255372 e rs7903146 do gene *TCF7L2* em relação à progressão ao DM em indivíduos com tolerância prejudicada à glicose. Após um período de três anos, os participantes portadores do genótipo de risco TT do polimorfismo rs7903146 foram mais propensos a progredir do estado de intolerância à glicose ao DM que os homozigotos CC. Os autores salientam que o genótipo TT estava associado à redução na secreção da insulina, mas não ao aumento na resistência à ação da insulina. Resultados similares foram observados em relação ao *SNP* rs12255372.

No ano seguinte, Shaat *et al.* (2007) verificaram a associação de variantes do gene *TCF7L2* (rs7903146) em relação ao risco de desenvolvimento de DMG em mulheres escandinavas. As frequências dos genótipos CC, CT e TT do polimorfismo rs7903146 diferiram significativamente entre mulheres com DMG e o grupo controle, sendo o alelo T associado a um risco aumentado de DMG. Comparadas às portadoras do genótipo CC, as gestantes portadoras dos genótipos CT e TT apresentaram risco de 1,6 e 2,1 vezes, respectivamente, de desenvolver DMG. Portanto a variante rs7903146 do gene *TCF7L2* está associada a um risco aumentado de DMG em mulheres escandinavas.

De acordo com Dahlgren *et al.* (2007), foi demonstrado que os alelos de risco (T) dos *SNPs* rs7903146 e rs12255372 estão associados a níveis diminuídos de insulina no plasma, afetando a progressão ao DM em indivíduos com tolerância diminuída à glicose. Com base nestes achados, foi sugerido que o risco aumentado de DM2 associado a variantes do gene *TCF7L2* pode ser causado pela função prejudicada das células beta, afetando a secreção de insulina estimulada pela glicose.

Lyssenko *et al.* (2007) genotiparam indivíduos suecos e finlandeses para os *SNPs* rs7903146 e rs12255372. Os genótipos CT/TT do *SNP* rs7903146 foram fortes preditores do desenvolvimento de DM2. O alelo de risco T estava associado a prejuízos na secreção de insulina e aumento da produção de glicose hepática. Os autores concluíram que o risco aumentado de DM2 conferido pelas variantes do gene *TCF7L2* envolve expressão exacerbada do gene nas ilhotas e prejuízos na secreção de insulina.

Segundo Dutra *et al.* (2008), variantes do gene *TCF7L2* têm sido associadas ao DM2 e secreção prejudicada da insulina. Entre elas, o alelo T do polimorfismo rs7903146 é provavelmente o melhor marcador para avaliar o efeito deste gene no risco de DM2.

Gupta *et al.* (2008) fizeram uma revisão de vários estudos de associação envolvendo o gene *TCF7L2*, e concluíram uma forte associação entre os alelos de risco do gene *TCF7L2* e o DM2, o que poderia predizer o risco de DM2 de forma prospectiva. Os autores salientam que os dois *SNPs* mais frequentemente estudados e promissores são rs12255372 e rs7903146.

Polimorfismos do gene *TCF7L2* estão associados a elevações no risco de DM2 em diferentes populações ao redor do mundo. Marquezine *et al.* (2008) realizaram um estudo com o objetivo de confirmar o efeito do polimorfismo rs7903146 no risco do desenvolvimento de DM2 em uma população brasileira portadora de doença coronariana. Como conclusão, verificaram que o alelo T do polimorfismo rs7903146 do gene *TCF7L2* está associado a um risco 1,57 vezes maior de desenvolvimento de DM2 na população estudada.

Segundo Robitaille e Grant (2008), a associação entre variantes do gene *TCF7L2* e o DMG foi estudada em duas populações diferentes. O alelo T do *SNP* rs7903146 foi associado a um risco aumentado de DMG em gestantes escandinavas. Foi observado também que o alelo T do *SNP* rs12255372 era mais frequente em mulheres mexicanas de etnia hispano-americanas com o DMG prévio, quando comparadas aos controles. Estes resultados sugerem que o gene *TCF7L2* possa estar envolvido no DMG.

De acordo com Cornelis *et al.* (2009), polimorfismos do gene *TCF7L2* estão associados a fenótipos diabéticos, caracterizados por secreção diminuída de insulina e função prejudicada das células beta, mas não à sensibilidade à insulina. Além disso, variantes do gene *TCF7L2* influenciam a eficácia das sulfonilureias (agentes que promovem a secreção de insulina), mas não a eficácia da metformina (sensibilizador da insulina). Juntos, estes estudos sugerem que a perda progressiva da secreção de insulina pode ser o componente essencial do fenótipo, o qual predispõe os portadores de variantes do gene *TCF7L2* ao desenvolvimento de DM2.

Ereqat *et al.* (2010) avaliaram a associação do polimorfismo rs7903146 ao DM2 em palestinos. O alelo T aumentou significativamente o risco de DM2. Nenhuma associação significativa foi observada entre os genótipos CC, CT e TT e

idade, sexo, IMC e colesterol total. Entre o grupo de diabéticos, os portadores do genótipo TT apresentaram idade de diagnóstico da doença menor que os portadores CT.

Papadopoulou *et al.* (2011) genotiparam os *SNPs* rs7903146 e rs12255372 em 826 mães suecas com DMG e 1.185 controles saudáveis. Os genótipos CT e TT do polimorfismo rs7903146, e os genótipos GT e TT do polimorfismo rs12255372 foram fortemente associados ao DMG, mesmo após ajuste para idade materna, número de gestações e história familiar de diabetes.

Vários estudos têm demonstrado a associação dos *SNPs* rs7903146 e rs12255372 ao risco de DM2. Porém, poucos avaliaram a associação de polimorfismos do gene *TCF7L2* a neoplasias. Algumas investigações demonstraram que o polimorfismo rs12255372 estava associado a um risco aumentado de câncer de mama familiar e aumento da agressividade do câncer de próstata, e que o polimorfismo rs7903146 estava associado ao risco de câncer colorretal e pulmonar (NAIDU *et al.*, 2011).

A população nipo-brasileira apresenta uma das mais elevadas prevalências de diabetes. Por este motivo, Franco *et al.* (2011) avaliaram se os *SNPs* rs7903146 e rs12255372 poderiam predizer o desenvolvimento de intolerância à glicose nesta população. Os autores não encontraram nenhuma associação entre a incidência de intolerância à glicose e os *SNPs* estudados. Portanto, nesta população polimorfismos do gene *TCF7L2* não exercem contribuições significativas na incidência de anormalidades à tolerância à glicose.

Ekelund *et al.* (2012) examinaram se variantes genéticas que predisõem ao DM2 podem predizer o desenvolvimento de DM2 após DMG em uma população da Suécia. Após ajustes para idade e etnia, verificaram que os polimorfismos rs7903146 (gene *TCF7L2*) e rs8050136 (gene *FTO*) foram capazes de predizer o DM2 após DMG. No entanto, salientaram que estudos adicionais, em outras populações, são necessários para confirmação dos resultados.

Klein *et al.* (2012) analisaram os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 em 125 mulheres caucasoides com DMG e 125 controles saudáveis. As mulheres com DMG eram significativamente mais velhas, apresentavam IMC significativamente mais elevado e eram mais frequentemente homozigotas para o alelo T do polimorfismo rs12255372, em comparação aos controles saudáveis. Os autores concluíram que a variante homozigota TT do polimorfismo rs12255372 é um fator de

risco independente para o DMG, e que a variante homozigota TT do polimorfismo rs7903146 não o é.

Zhang *et al.* (2013) conduziram uma meta-análise para avaliar a associação do polimorfismo rs7903146 com o DM2 em uma população de chineses Han. As evidências acumuladas sugerem que o alelo T do polimorfismo rs7903146 está associado a um risco elevado de DM2 nesta população.

Ciccacci *et al.* (2012) analisaram os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 em 154 italianos com DM2 e 171 controles saudáveis. Os dois *SNPs* mostraram forte associação com a suscetibilidade ao DM2 e suas complicações, como retinopatia diabética e doença arterial coronariana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo CEP do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob o Registro CEP/SD: 1045.170.10.11 e CAAE: 5876.0.000.091-10 (ANEXO 1).

4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram cedidas pela doutoranda Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos-Weiss e encontram-se disponíveis no banco de amostras do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia e Bioquímica da UFPR, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Geraldo Picheth.

4.1.1 Critérios para caracterização da amostra

Pelo fato desta pesquisa apresentar um desenho caso-controle, a amostra foi subdividida em dois grupos: grupo de gestantes com diagnóstico de DMG e grupo controle. Os critérios para caracterização destes grupos encontram-se descritos a seguir, estando de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009):

- Grupo com DMG: gestantes que apresentam no TOTG com ingestão de 75g de glicose, realizado entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, uma glicemia de jejum $\geq 110\text{mg/dL}$ ou glicemia $\geq 140\text{ mg/dL}$ 2 horas após a ingestão de 75g oral glicose.
- Grupo controle para DMG: gestantes que apresentaram glicemia de jejum inferior a 85mg/dL e gestação sem registros de anormalidades.

Além dos parâmetros utilizados para diagnóstico das gestantes com DMG também foram adotados critérios para definir hipertensão arterial, tabagismo, uso de insulina e macrosomia do recém-nato.

Os critérios para estabelecer a hipertensão arterial estão descritos nas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2009), que a caracterizam quando a pressão arterial sistólica é $\geq 130\text{mmHg}$ e a diastólica $\geq 80\text{mmHg}$, ou quando há uso de agentes anti-hipertensivos.

Para a definição de fumantes, os critérios utilizados foram os preconizados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009), onde se entende como fumante o indivíduo que já fumou mais de uma centena de cigarros ao longo da vida e ainda

fuma; ex-fumantes os que fumaram mais de 100 cigarros na vida e deixaram o hábito há pelo menos um dia, e não fumantes aqueles que nunca fumaram, só experimentaram o cigarro ou que fumaram menos de 100 cigarros ao longo da vida.

Quanto ao uso de insulina, de acordo com a SBD (2009), pacientes que necessitam fazer uso do hormônio são aquelas nas quais o controle dietético não é suficientemente capaz de reduzir os níveis glicêmicos, com a glicemia de jejum mantendo-se superior a 95 mg/dL e a pós-prandial maior que 130 mg/dL.

A respeito da macrosomia, Zhang *et al.* (2008) definem recém-natos macrosômicos como aqueles que apresentam peso ao nascer superior a 4 kg.

Foram considerados como fatores de risco para diabetes a obesidade ($IMC > 30\text{kg/m}^2$), história familiar de diabetes, idade superior a 25 anos, presença de natimortos ou macrosomia em gestações anteriores.

4.1.2 Grupo de gestantes com diagnóstico de DMG

O grupo de gestantes com DMG foi constituído por 200 pacientes com diagnóstico de DMG, provenientes da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC da UFPR - SEMPR, coordenada pela Professora Dra. Rosângela Roginski Rea, colaboradora do projeto.

As amostras de sangue das pacientes foram coletadas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante. Os dados antropométricos, clínicos e laboratoriais das mesmas foram obtidos nos prontuários do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR, dispensando-se a necessidade de entrevista.

4.1.3 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 200 gestantes saudáveis, sem diagnóstico de DMG, provenientes do Laboratório Municipal de Curitiba, da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba (Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o registro 97/2008).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram coletadas sem anticoagulante, em tubo com gel separador. Foram centrifugadas por 10 minutos a 3.200g (Centrífuga 1420 - *Eppendorf*). Após centrifugação, o soro foi separado em alíquotas e mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas foram excluídas de todos os ensaios.

As dosagens séricas dos analitos em estudo (glicemia, ácido úrico, albumina, colesterol total, creatinina, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol, proteínas totais, triglicérides e ureia) foram realizadas em sistema automatizado *Architect®* (Abbott), empregando-se reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante.

O colesterol da fração LDL foi calculado pela equação de Friedewald, $LDL-C = \text{Colesterol total} - HDL-C - TG/5$ (IV Diretriz Brasileira em Dislipidemia, 2007).

A dosagens de hemoglobina glicada (HBA1C) foram realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC – Varian II*, Biorad), de acordo com as recomendações do fabricante.

O 1,5 anidroglicitol (1,5AG) foi quantificado com o método enzimático GlycoMark(GlycoMark, Inc.), em sistema automatizado Cobas Mira (Roche).

O índice de risco para doença cardiovascular, $\log(TG/HDL-C)$ também foi calculado e avaliado (DOBIASOVA *et al.*, 1998).

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

4.3.1 Variabilidades genéticas em estudo

Na TABELA 6 são apresentados os genes e os polimorfismos genéticos estudados.

TABELA 6 – GENES, POLIMORFISMOS ANALISADOS E MÉTODO DE GENOTIPAGEM

GENES	POLIMORFISMOS	MÉTODO DE GENOTIPAGEM <i>TaqMan</i> ®
<i>FTO</i>	rs9939609	C_30090620_10
	rs8050136	C_20311259_10
<i>TCF7L2</i>	rs7903146	C_29347861_10
	rs12255372	C_291484_20

rs, reference SNP, obtido em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/s>
Códigos do sistema *TaqMan*

4.3.2 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir das células nucleadas de amostras de sangue periférico coletado com EDTA. O método empregado foi o de *Salting Out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) modificado (ANEXO 2).

O DNA é uma molécula muito estável, que não é afetada por reagentes e condições que destroem outros constituintes celulares. O método de *salting out* é um procedimento rápido, que fornece DNA de elevada pureza, e tem como fundamento a lise de membranas celulares por detergentes e/ou soluções hipotônicas, seguido da liberação do DNA nuclear. O DNA liberado das células é separado dos restos celulares e proteínas, que são precipitados por uma solução salina saturada. O DNA presente na solução saturada é precipitado pela adição de etanol.

4.3.3 Determinação da concentração das suspensões de DNA genômico

Após o isolamento do DNA genômico procedeu-se a sua quantificação no equipamento *NanoDrop 2000* (*ThermoScientific*), que trata-se de um espectrofotômetro, com um sistema de pedestais de quartzo. Sua faixa de leitura é de 190 a 840 nanômetros, e a fonte de luz é uma lâmpada de xenônio.

As amostras de DNA são colocadas diretamente no botão do pedestal do equipamento, após se fazer um branco usando água ultrapura, sem a necessidade de diluição. No computador acoplado ao espectrofotômetro é possível visualizar a concentração da amostra, não havendo necessidade de cálculos adicionais.

Amostras que apresentaram concentrações de DNA superiores a 100 ng/μL e pureza (razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280}) de 1,8 a 2,0 foram consideradas adequadas para este estudo (SAMBROOK *et al.*, 1989). Aquelas que apresentaram resultados fora dos parâmetros de concentração e pureza mencionados foram submetidas a novas extrações.

Todas as amostras foram diluídas a uma concentração final de 100 ng/μL com água ultrapura e estocadas em freezer a -20°C.

Para as análises de genotipagem com o sistema *TaqMan*[®], as amostras foram diluídas a 20ng/μL, utilizando-se água ultrapura.

4.3.4 Métodos moleculares

As genotipagens das variações dos genes *TCF7L2* e *FTO* foram realizadas com sondas fluorescentes específicas (sistema *TaqMan*[®] - *Applied Biosystems*).

No sistema *TaqMan*[®] as sondas consistem de um fluoróforo (VIC[®], FAM[™]) covalentemente ligado à extremidade 5' da sonda de oligonucleotídeo e um silenciador (*quencher*) na extremidade 3'. A molécula do silenciador extingue a fluorescência emitida pelo fluoróforo, quando excitado pela fonte de luz. Quando fluoróforo e silenciador estão próximos, portanto, o silenciador inibe qualquer sinal fluorescente.

As sondas *Taqman*[®] são desenhadas de modo a anelarem à região do DNA amplificada por oligonucleotídeos específicos (*primers*). À medida que a enzima Taq polimerase estende o *primer* e sintetiza a fita nascente, a atividade de exonuclease 5'-3' da polimerase degrada a sonda (*probe*) que estava anelada ao DNA molde. A degradação da *probe* libera o fluoróforo, diminuindo sua proximidade do silenciador, removendo o efeito de extinção da fluorescência do silenciador, permitindo a emissão de fluorescência pelo fluoróforo. Assim, a fluorescência detectada é diretamente proporcional ao fluoróforo liberado e à quantidade de DNA molde presente na reação de amplificação. As Figuras 7 e 8 ilustram as reações do sistema com sondas fluorescentes *Taqman*[®].

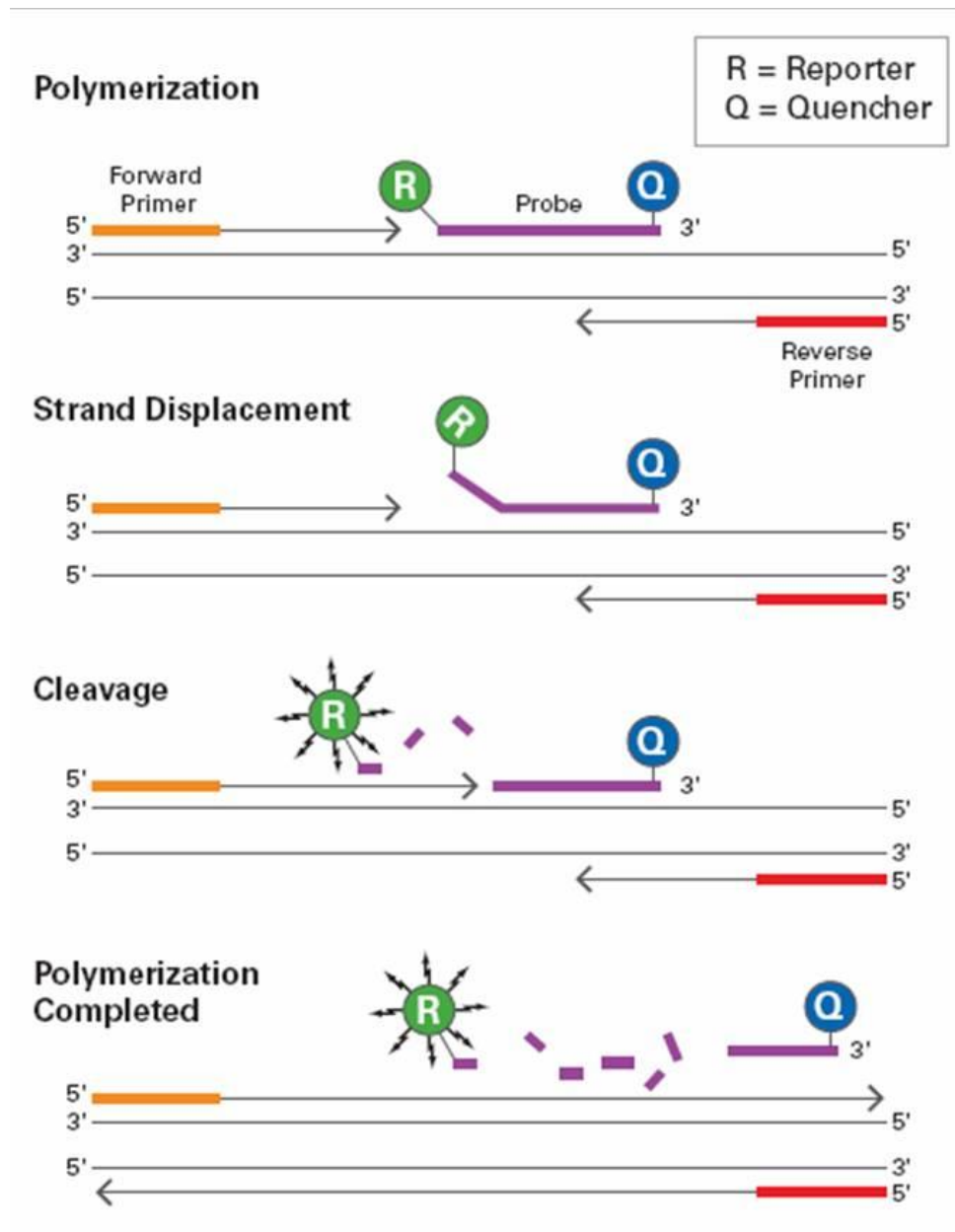


FIGURA 7 - PRINCÍPIO DA GENOTIPAGEM COM SONDAS FLUORESCENTES COM O SISTEMA *TAQMAN*®

Sondas (*probes*), marcadas com os fluoróforos VIC e FAM, ligadas a um silenciador (*quencher*), um para cada alelo, desenhadas para anelar especificamente na região do polimorfismo (SNP) de interesse, anela no DNA molde. Em paralelo, *primers* desenhados para amplificar a região de estudo também anelam ao DNA molde. Pela ação exonuclease ($5' \rightarrow 3'$) da polimerase a sonda anelada ao DNA é clivada, liberando o fluoróforo. Conforme a fluorescência emitida, se identificam os alelos em estudo ou a presença de ambos (heterozigotos) utilizando equipamento de PCR com tempo real.

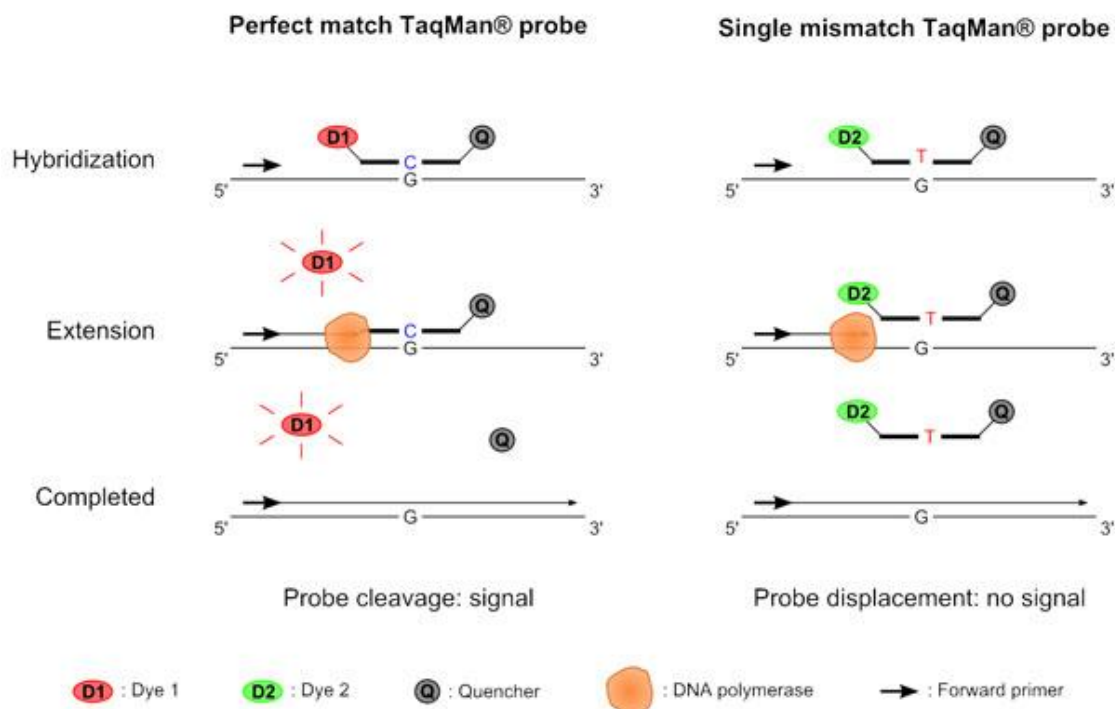


FIGURA 8 - PRINCÍPIO DO ENSAIO DE TAQMAN®

Mecanismos de sinalização das sondas fluorescentes *TaqMan* para a genotipagem de sítios específicos no DNA (SNPs). A figura à esquerda mostra a sequência de eventos na possibilidade de pareamento perfeito da sonda com o DNA molde indicando a identificação do alelo. Neste caso há a emissão de fluorescência específica para este alelo. Na sequência à direita a sonda não pareia com o DNA molde e, portanto não emite fluorescência.

Os experimentos de genotipagem foram realizados no equipamento *StepOnePlus™* (*Applied Biosystems*), utilizando-se reagentes (*Master Mix®*, *SNP Genotyping Assay®*) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante.

O protocolo utilizado nas análises de *TaqMan®* e as condições de reação são apresentados nas TABELAS 7 e 8.

TABELA 7 - PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM O SISTEMA TAQMAN®

REAGENTES	VOLUMES (volume final = 6,0µL)
<i>Master Mix</i> ®	3,0 µL
<i>SNP Genotyping Assay</i> ®(40X)	0,3µL
Água ultrapura	1,7µL
DNA molde(20ng/µL)	1,0µL

Master Mix®: sistema de reação composto pela DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas *TaqMan*®.

TABELA 8 - CICLOS TÉRMICOS DE REAÇÃO PARA AS ANÁLISES DE TAQMAN® - SISTEMA STEPONEPLUS™

ATIVAÇÃO DA ENZIMA <i>AMPLITAQ GOLD</i> ®	PCR (40 CICLOS)	
1 CICLO (ativação)	Desnaturação	Anelamento/Extensão
10 min a 95°C	15 s a 92°C	1min a 60°C

Uma mistura de reação foi obtida por meio da combinação dos reagentes *Master Mix*®, *SNP Genotyping Assay*® e água ultrapura. Após homogeneização, 5µL desta mistura de reação foi adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços, específica para ensaios fluorescentes.

A seguir, 1µL do DNA genômico na concentração de 20ng/µL foi adicionado em placa de 96 poços. A placa foi coberta com filme específico para ensaios fluorescentes. Esta, em seguida, foi centrifugada por 4 minutos a 4.000 rpm para remoção de eventuais bolhas e deposição total do volume no fundo de cada poço (Centrífuga Eppendorf 5810R), e mantida em gelo até o momento da análise no sistema *StepOnePlus*™ (*Applied Biosystems*).

Em cada placa foram utilizados dois controles negativos (apenas a mistura de reação, sem adição de DNA).

Os resultados das genotipagens (homozigoto para o alelo normal, heterozigoto ou homozigoto para o alelo de risco) são apresentados na forma gráfica de discriminação alélica, como exemplificado na FIGURA 9. Em todas as análises a qualidade superior a 98% na genotipagem foi obtida, conforme o associado ao sistema StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*). A qualidade da genotipagem obtida tornou dispensável o sequenciamento dos produtos de PCR para confirmação dos genótipos.

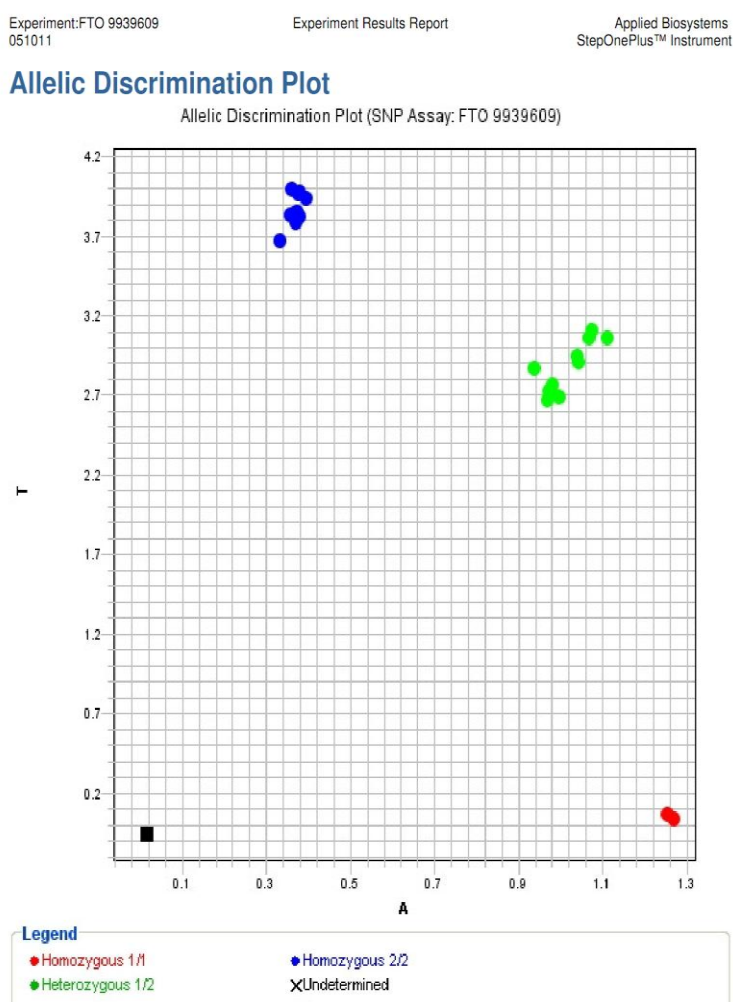


FIGURA 9 - EXEMPLO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA COM O SISTEMA DE SONDAS FLUORESCENTES *TAQMAN*®

No exemplo os homozigotos para os alelos T e A (1/1 e 2/2) são representados pelos círculos azuis e vermelhos. Os círculos verdes caracterizam os heterozigotos que emitem as fluorescências das duas sondas. O quadrado (negro) representa o controle negativo (mistura de reação sem DNA). Figura e dados retirados do *software* que acompanha o equipamento *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas foram analisadas para verificação da normalidade pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Lilliefors*. As variáveis IMC, colesterol total, proteínas totais, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol e logTG/HDL-C apresentaram distribuição normal. As demais variáveis: idade, glicemia, glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose, HbA1C, creatinina, ureia, ácido úrico, triglicérides e albumina não mostraram distribuição normal.

Variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio do Teste t de Student para amostras não pareadas e pela análise de variância (ANOVA). Variáveis sem distribuição normal foram comparadas com o teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise de variância foi empregada para avaliar a associação dos genótipos com os biomarcadores e características antropométricas em estudo. Nestas comparações, a probabilidade nas análises de comparações entre os genótipos 2 a 2 foi corrigida com o teste de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*).

Para as variáveis categóricas foram utilizados os Testes de Chi-Quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fischer bidirecional (RxC) (MILLER, 1999), conforme apropriado. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). As frequências dos alelos raros para os polimorfismos em estudo com dados da literatura foram consideradas diferentes quando diferentes dos limites do intervalo de confiança de 95%.

As análises de correlação foram realizadas aplicando o modelo de correlação linear de Pearson. Os genótipos de maior frequência foram codificados como 1, os heterozigotos como 2 e os genótipos menos frequentes como 3.

Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada estatisticamente significativa em todas as análises. As análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico Statistica v.8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A estatística descritiva dos dois grupos em estudo (grupo controle e grupo DMG) é apresentada na TABELA 9, e inclui média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação.

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANTROPOMÉTRICAS DA AMOSTRA EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=200)	DMG (n=200)	P
Idade (anos)	24,0 (20,0-28,0)	32,0 (28,0-36,0)	<0,001*
Etnia,%			-
Euro-Brasileiras	-	88,0	
Afro-Brasileiras	-	12,0	
Semana de gestação ao diagnóstico	17,0 (12,0-24,0)	31,0 (29,0-34,0)	<0,001*
Peso (kg)	64,4±11,0	84,1±17,9	<0,001
Altura (m)	1,61±0,06	1,59±0,07	0,061
IMC (kg/m ²)	24,9±4,0	33,0±6,4	<0,001
§Hipertensão arterial, n (%)	1 (0,5)	13 (6,5)	0,001
§Tabagismo, n (%)			<0,001**
Não fumante	1 (0,5)	99 (49,5)	
Ex-fumante	2 (1)	53 (26,5)	
Fumante	5 (2,5)	15 (7,5)	
§Uso de insulina, n (%)	-	82 (41)	-
§Fator de risco para diabetes, n(%)	1 (0,5)	175 (87,5)	<0,001**
História familiar de diabetes, n(%)	-	138 (69)	-
História familiar de DAC, n(%)	-	120 (60)	-

Os valores são apresentados com média (±1-DP); mediana (intervalo interquartil) ou % ou n.

Controle, gestantes saudáveis; DMG, gestantes com diabetes gestacional.

DAC, Doença arterial coronariana; IMC, Índice de massa corporal;

-, Dados não disponíveis.

P, probabilidade teste t-Student (variáveis independentes); *teste de Mann-Whitney (não paramétrico) ou ** teste do Chi-quadrado.

§Critérios descritos no item 4.1.1 do Material e Métodos.

5.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

Os parâmetros laboratoriais referentes às amostras em estudo são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - COMPARAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=200)	DMG (n=200)	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	83,0 (78,0-87,0)	87,5 (82,0-99,0)	<0,001*
2-h 75g de glicose (mg/dL)	-	164,0 (149,5-184,0)	
HbA1C (%)	-	5,7 (5,4-6,1)	
1,5AG (μg/mL)	14,9(10,5-20,0)	9,5 (6,0-12,8)	<0,001*
Colesterol (mg/dL)	190±50,2	229,5±49,3	<0,001
HDL-C (mg/dL)	46,5±10,8	55,7±13,4	<0,001
LDL-C (mg/dL)	121,7±40,7	123,7±40,8	0,612
Triglicérides (mg/dL)	101,0(77,0-132,0)	224,0(184,0-286,0)	<0,001*
Log (TG/HDL-C)	0,35±0,19	0,61±0,20	<0,001
Proteína Total (g/dL)	7,1±0,6	6,4±0,6	<0,001
Albumina (g/dL)	3,9(3,5-4,5)	3,3(3,1-3,6)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,8(0,7-0,8)	0,6(0,6-0,7)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	20,0 (17,0-25,0)	16,0(13,0-19,5)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,4(3,0-3,8)	4,4(3,8-5,2)	<0,001*

Os valores são apresentados com média (±1-DP) ou mediana (intervalo interquartil).

Controle, gestantes saudáveis; DMG, gestantes com diabetes gestacional;

-, Dados não disponíveis.

P, probabilidade teste t-Student (variáveis independentes); *teste de Mann-Whitney (não paramétrico)
LDL-C, calculado com a equação de Friedewald.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

As comparações entre os dois grupos estudados, incluindo as frequências genotípicas, alélicas e as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg encontram-se descritas nas TABELAS 11 e 12.

TABELA 11 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS rs12255372 e rs7903146 DO GENE *TCF7L2* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIABETES GESTACIONAL

Genes		Controle	DMG	P
Polimorfismos		(n= 200)	(n= 200)	
<i>TCF7L2</i>				
(rs12255372)	G/G	102 (51,0)	92 (46,0)	0,205
	G/T	75 (37,5)	88 (44,0)	
	T/T	23 (11,5)	20 (10,0)	
Frequência do alelo [95% IC]	H- W (P)	0,115	0,876	0,593
	T	0,30	0,32	
		[0,26-0,35]	[0,27-0,37]	
<i>TCF7L2</i>				
(rs7903146)	C/C	98 (49,0)	76 (38,0)	0,085
	C/T	86 (43,0)	104 (52,0)	
	T/T	16 (8,0)	20 (10,0)	
Frequência do alelo [95% IC]	H- W (P)	0,633	0,070	0,050*
	T	0,29	0,36	
		[0,25-0,34]	[0,31-0,41]	

Valores dos genótipos são n (%)

*H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

Frequência do alelo raro

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P, teste do chi-quadrado (χ^2) para as frequências genotípicas e alélicas*.

TABELA 12 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS rs8050136 e rs9939609 DO GENE *FTO* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIABETES GESTACIONAL

Genes Polimorfismos		Controle (n= 200)	DMG (n= 200)	P
<i>FTO</i> (rs8050136)				
	C/C	74 (37,0)	73 (36,5)	0,725
	A/C	96 (48,0)	102 (51,0)	
	A/A	30 (15,0)	25 (12,5)	
	H- W (P)	0,900	0,244	0,771
Frequência do alelo	A	0,39	0,38	
[95% IC]		[0,34-0,44]	[0,33-0,43]	
<i>FTO</i> (rs9939609)				
	T/T	71 (35,5)	68 (34,0)	0,946
	A/T	97 (48,5)	100 (50,0)	
	A/A	32 (16,0)	32 (16,0)	
	H- W (P)	0,906	0,636	0,829*
Frequência do alelo	A	0,40	0,41	
[95% IC]		[0,35-0,45]	[0,36-0,46]	

Valores dos genótipos são n (%)

*H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

Frequência do alelo raro

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P, teste do chi-quadrado (χ^2) para as frequências genotípicas e alélicas*.

5.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON

As análises de correlação linear de Pearson foram realizadas empregando-se as variáveis apresentadas nas Tabelas 9 e 10, tanto para os grupos controle quanto DMG. Já, a TABELA 13 mostra as correlações significativas para os polimorfismos *rs12255372* e *rs7903146* do gene *TCF7L2*.

TABELA 13 - VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA OS POLIMORFISMOS *rs12255372* e *rs7903146* DO GENE *TCF7L2*

Polimorfismo do gene <i>TCF7L2</i>	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>rs12255372</i>	Controle	200	Sem correlação significativa	—	—
	DMG	200	2h 75g de glicose	-0,212	0,017
			1,5 AG	-0,201	0,023
<i>rs7903146</i>	Controle	200	Idade	0,147	0,011
			TG	0,168	0,004
			Log(TG/HDL-C)	0,143	0,014
	DMG	200	Idade	0,288	0,019

r, coeficiente de correlação

A TABELA 14 mostra as correlações significativas para os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO*.

TABELA 14 - VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA OS POLIMORFISMOS rs9939609 e rs8050136 DO GENE *FTO*

Polimorfismo do gene <i>FTO</i>	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
rs9939609	Controle	200	IMC	0,103	0,044
	DMG	200	TG	-0,271	0,019
			Albumina	0,239	0,007
			Log (TG/HDL-C)	-0,279	<0,001
rs8050136	Controle	200	Sem correlação significativa	—	—
	DMG	200	HAS	0,176	0,048

r, coeficiente de correlação;
HAS, Hipertensão Arterial Sistêmica

5.5 ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Os grupos em estudo foram combinados e a análise de variância foi empregada para avaliar a associação dos genótipos com os biomarcadores e características antropométricas em estudo. Nestas comparações, a probabilidade nas análises de comparações entre os genótipos 2 a 2 foi corrigida com o teste de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*).

A TABELA 15 mostra as análises de variância significativas entre os biomarcadores em estudo e genótipos dos polimorfismos do gene *TCF7L2*.

O gene *FTO* não apresentou nenhuma associação significativa com os biomarcadores em estudo.

TABELA 15 - ANÁLISES DE VARIÂNCIA SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS BIOMARCADORES EM ESTUDO E GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO GENE *TCF7L2*

POLIMORFISMOS DO GENE <i>TCF7L2</i>	VARIÁVEIS n=400	P-ANOVA
rs7903146	Triglicérides	0,038
	1,5 anidroglucitol	0,033
rs12255372	1,5 anidroglucitol	0,038

Os polimorfismos com associação entre genótipos e biomarcadores identificados pela ANOVA foram avaliados em detalhes, e mostrados nas FIGURAS 10 a 13.

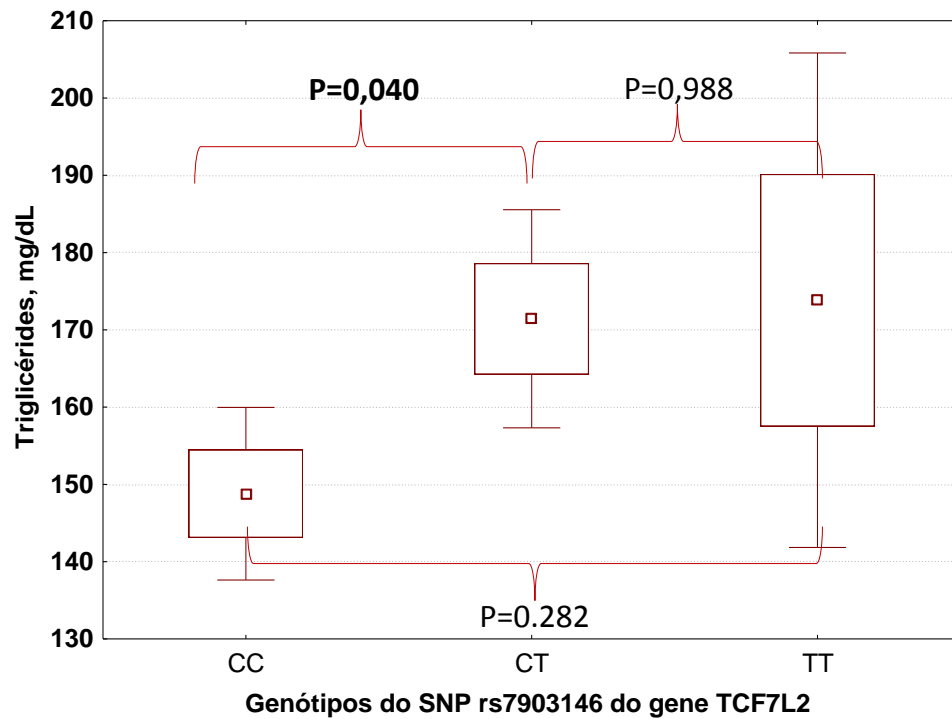


FIGURA 10 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs7903146 DO GENE *TCF7L2* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TRIGLICÉRIDES

Os valores são apresentados em média (quadrado central), 1-Desvio Padrão (caixa) e 2-Desvios Padrões (barras verticais). Os valores de Probabilidade representam as comparações corrigidas com o teste de Tukey.

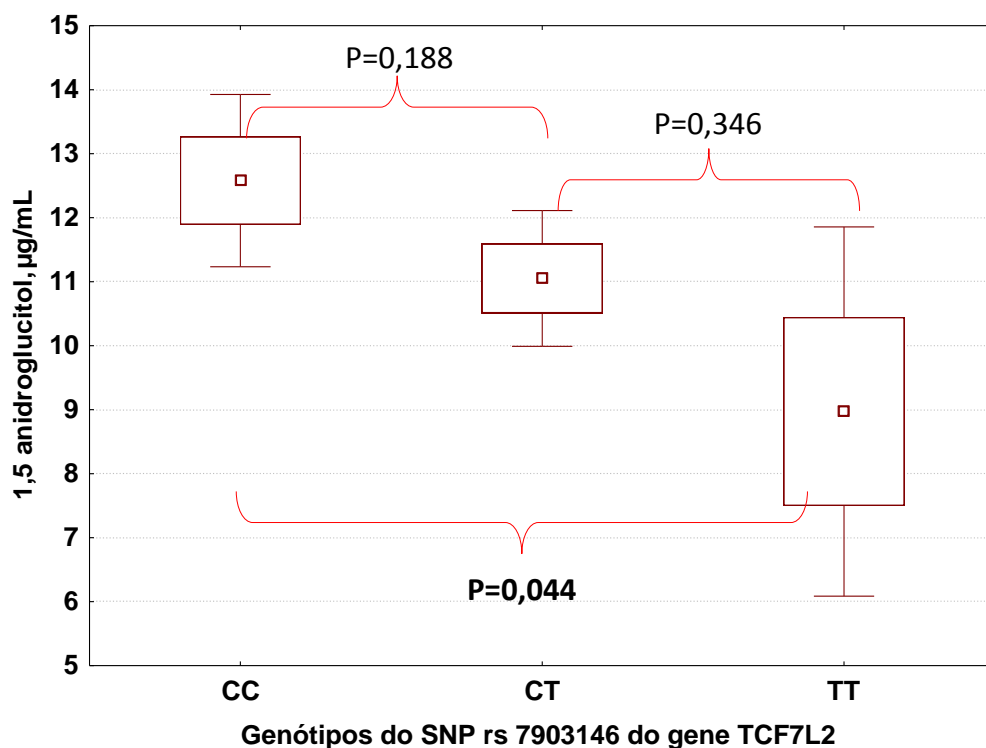


FIGURA 11 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs7903146 DO GENE *TCF7L2* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE 1,5 ANIDROGLUCITOL

Os valores são apresentados em média (quadrado central), 1-Desvio Padrão (caixa) e 2-Desvios Padrões (barras verticais). Os valores de Probabilidade representam as comparações corrigidas com o teste de Tukey.

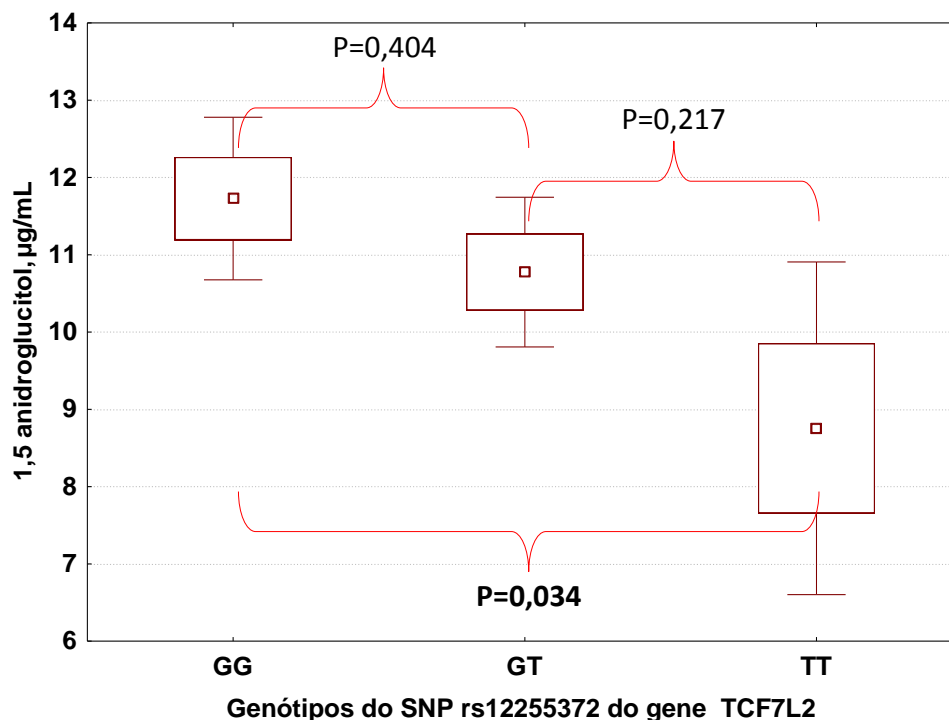


FIGURA 12 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs12255372 DO GENE *TCF7L2* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE 1,5 ANIDROGLUCITOL

Os valores são apresentados em média (quadrado central), 1-Desvio Padrão (caixa) e 2-Desvios Padrões (barras verticais). Os valores de Probabilidade representam as comparações corrigidas com o teste de Tukey.

A análise do índice de massa corporal (IMC) não apresentou resultados significativos quando avaliado pelo ensaio de ANOVA com os genótipos em estudo, considerando a amostra total.

Quando realizada uma análise separada para os grupos em estudo para o polimorfismo rs8050136 do gene *FTO* em relação ao índice de massa corporal (IMC), foi identificado que o genótipo em homozigose de risco AA apresenta maior IMC, quando comparado com o genótipo CA (heterozigoto), como demonstrado na FIGURA 13.

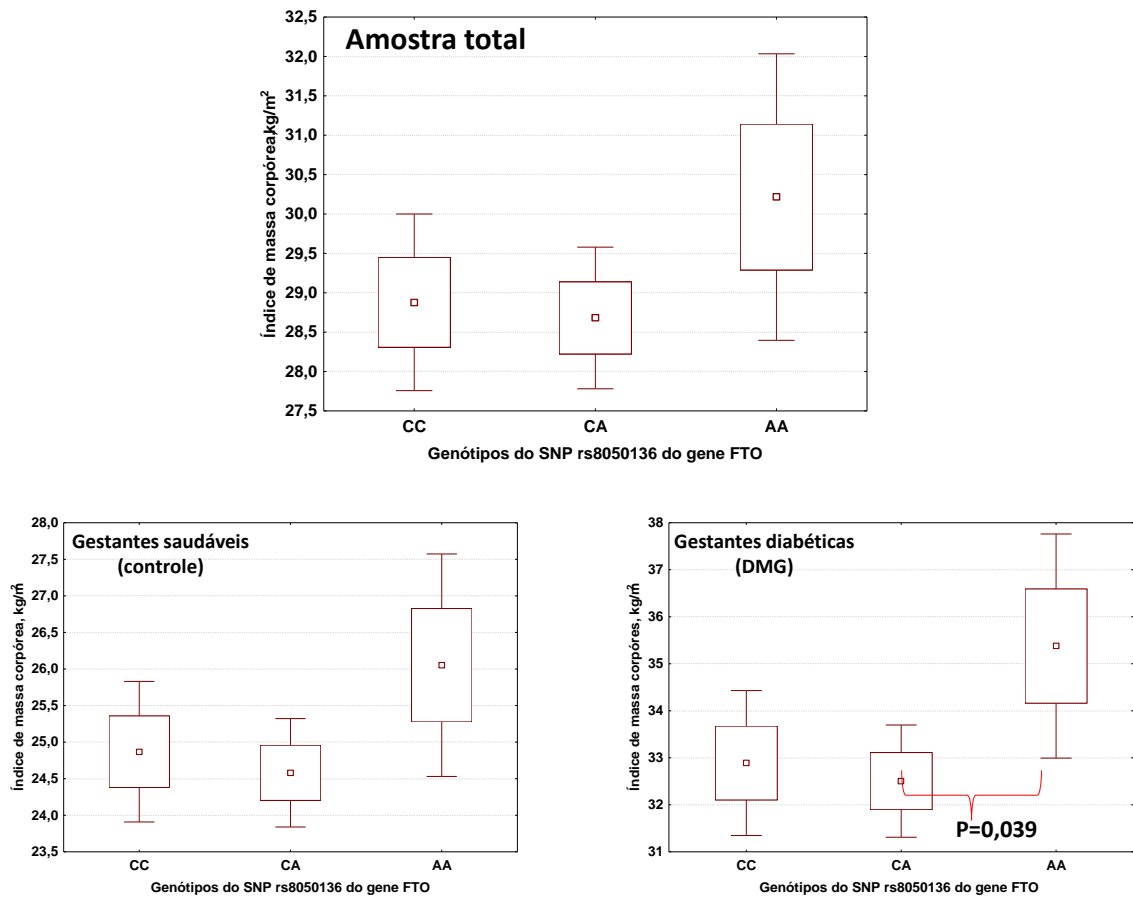


FIGURA 13 - EFEITO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs8050136 DO GENE *FTO* SOBRE O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC).

Os valores são apresentados em média (quadrado central), 1-Desvio Padrão (caixa) e 2-Desvios Padrões (barras verticais). As comparações entre os genótipos e o IMC na amostra total e separada pelos grupos em estudo não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$) exceto no grupo DMG onde o genótipo AA foi associado significativamente a maior IMC.

6 DISCUSSÃO

O *Diabetes Mellitus* Gestacional (DMG) é um relevante problema de saúde pública, e está relacionado a complicações para a mãe e para o feto/neonato, tanto durante a gestação, quanto durante o parto (HORVATH *et al.*, 2010). Ocorre em 1 a 14% de todas as gestações, sendo esta ampla variação decorrente da falta de padronização dos testes de triagem e dos critérios diagnósticos, assim como de diferenças na distribuição genética (grupo étnico estudado) e de fatores de risco ambientais (TORLONI *et al.*, 2008).

A forte associação entre o DMG e o DM2, e o fato de muitos fatores de risco (história familiar de diabetes, IMC elevado, idade avançada e origem asiática e afrodescendentes) serem comuns a ambas as patologias, sugerem que as duas patologias apresentam patogêneses semelhantes (KORPI-HYÖVÄLTI *et al.*, 2012).

Estudos genéticos sobre o DM2 sugerem que esta é uma patologia poligênica, na qual variantes em múltiplos genes interagem com fatores ambientais para causar a doença. Pelo fato da íntima correlação entre DMG e DM2, é provável que o DMG seja também uma patologia poligênica. Portanto, os estudos a respeito da etiologia do DMG têm como alvo a identificação de variantes dos genes que predisõem ao DM2 (ROBBITAILLE e GRANT, 2008). Entre estes genes, estão incluídos genes ligados à secreção da insulina, como o *TCF7L2*, e genes associados à obesidade, como o *FTO*.

Os genes estudados, *TCF7L2* e *FTO*, apresentam resultantes conflitantes em relação a sua associação ao DM2 e DMG. Enquanto algumas pesquisas demonstraram associação, outras foram negativas. As divergências entre os estudos podem estar associadas às características genéticas da população estudada. Desta forma, o presente estudo pode contribuir para a elucidação do efeito de polimorfismos dos genes analisados no DMG na população brasileira.

6.1 PARÂMETROS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

6.1.1 Idade

Os grupos controle e DMG divergem significativamente quanto à idade, sendo a média de idade do grupo DMG superior à do grupo controle (32 anos *versus* 24

anos, respectivamente), como observado na TABELA 9.

Este achado está relacionado ao risco para o DMG, que aumenta com a idade da gestante, sendo a idade inferior a 25 anos associada a baixo risco para a patologia (COUSTAN *et al.*, 1989; METZGER *et al.*, 2007).

Também a idade mais avançada das gestantes diabéticas é uma característica de pacientes atendidas em serviços especializados em gestações de risco, como é o caso do Hospital de Clínicas da UFPR.

6.1.2 Etnia

A etnia Euro-brasileira predomina no grupo DMG, portanto os resultados do presente estudo refletem primariamente este segmento populacional (TABELA 9).

O fator étnico é relevante em estudos genéticos, porém, não foram possíveis comparações de etnia entre os grupos controle e DMG, pois o Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba, de onde foram provenientes as amostras do grupo controle, não dispunha desta informação. No entanto, não há razões para se supor que o grupo controle não apresente similaridades étnicas ao grupo DMG, uma vez que são gestantes residentes na mesma região.

6.1.3 Semanas de gestação ao diagnóstico do DMG

O grupo com DMG apresenta maior idade gestacional ao diagnóstico (TABELA 9). A média de semanas de gestação ao diagnóstico do grupo DMG é superior à do grupo controle (31 semanas *versus* 17 semanas, respectivamente; $P < 0,001$).

Esta diferença entre os grupos estudados era esperada, em virtude do fator tempo, pois as gestantes caracterizadas como diabéticas pelo Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba são encaminhadas ao Hospital de Clínicas da UFPR, onde têm o diagnóstico confirmatório de DMG e atendimento especializado em um período médio de 30 semanas de gestação.

Cabe salientar que a triagem para o diagnóstico do DMG é recomendada entre a 24^a e 28^a semanas de gestação. Como o DMG traz riscos tanto para a mãe quanto para o feto/neonato, estudos demonstram que a ocorrência destes eventos adversos aumentam em função da glicemia materna na 24^a - 28^a semanas de

gestação (BALAJI *et al.*, 2007; ADA, 2012). Portanto, políticas públicas deveriam ser revistas, no sentido de reduzir o tempo de encaminhamento da gestante de risco a serviços especializados. Novas propostas para o diagnóstico precoce do diabetes gestacional estão em curso, com potencial para minimizar os riscos dos afetados pelo processo patológico (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 2008).

6.1.4 Peso, altura e IMC

Os grupos controle e DMG apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao peso (64,4kg *versus* 84,1kg, respectivamente) e IMC (24,9kg/m² *versus* 33,0kg/m², respectivamente) (TABELA 9).

O grupo controle, comparativamente ao grupo DMG, teve seus dados obtidos mais precocemente no período gestacional. Além disto, o aumento da resistência à insulina ao longo da gestação, o que promove aumento de peso fisiológico na gestante, e, conseqüentemente, aumento do IMC, explicam tais achados (BEN-HAROUSH, YOGEV e HOD, 2003; ROBBITAILLE e GRANT, 2008).

À medida que a gestação evolui, o aumento na resistência tecidual à insulina gera uma demanda por mais insulina. Nas gestações que transcorrem dentro de padrões de normalidade, isto é compensado pelo aumento da secreção pancreática de insulina, sendo, desta forma, o balanço entre resistência à insulina e seu fornecimento mantido. No entanto, nas pacientes com alterações no metabolismo de carboidratos prévias à gestação, e naquelas que não se adaptam às alterações fisiológicas da gravidez, há predomínio da resistência à insulina, a mulher torna-se hiperglicêmica, havendo aumento do ganho ponderal (MAUAD FILHO *et al.*, 1998; BEN-HAROUSH, YOGEV e HOD, 2003), o que também justifica o maior ganho de peso, e aumento no IMC, observado no grupo DMG.

Estudos ressaltam maior risco de desenvolvimento de DMG em mulheres com IMC elevado, comparativamente àquelas com IMC normal, o que também explica os achados do presente estudo. De acordo com Solomon *et al.* (1997), o risco para o desenvolvimento de DMG é de 2,13 para mulheres com IMC pré-gestacional de 25-29,9kg/m² e 2,90 para mulheres com IMC pré-gestacional \geq 30kg/m², ou seja, o risco de desenvolver DMG está associado positivamente ao IMC. O risco de gestantes com baixo peso, sobrepeso, obesidade moderada e obesidade

mórbida desenvolverem DMG é de 0,75; 1,97; 3,01 e 5,55, respectivamente. Para cada kg/m² de aumento no IMC, a prevalência de DMG aumenta em 0,92% (TORLONI *et al.*, 2008).

6.1.5 Pressão arterial

A hipertensão arterial ocorre em 5-7% de todas as gestações, e é a principal causa de complicação materno-fetal-neonatal (LINDHEIMER *et al.*, 2009).

No presente estudo, os grupos diferiram significativamente, sendo o número de gestantes com hipertensão maior no grupo DMG comparado ao grupo controle (13 *versus* 1, respectivamente), como observado na TABELA 9.

Resultados similares já foram descritos em outras investigações. Casey *et al.* (1997) relatam uma ocorrência estatisticamente significativa de hipertensão arterial em gestantes com DMG, comparativamente ao grupo controle (17% *versus* 12%, respectivamente). A discrepância da ocorrência de hipertensão entre o estudo de Casey *et al.* (1997) e o presente estudo pode ser atribuída às diferentes características das populações estudadas e aos diferentes critérios na seleção das pacientes.

Já, Gaio *et al.* (2001) relataram uma frequência de hipertensão de 7,5% em gestantes brasileiras, valor semelhante ao observado no estudo em tela (cerca de 7%).

Hedderson *et al.* (2008) salientaram que mulheres com hipertensão prévia à gestação, ou que desenvolvem hipertensão durante o primeiro trimestre da gestação, apresentam risco duas vezes maior de desenvolver DMG, comparativamente às normotensas.

6.1.6 Tabagismo

O uso de tabaco durante a gestação pode provocar problemas no recém-nascido, como asma, câncer, DM2, obesidade e patologias neurológicas (MONTGOMERY *et al.*, 2007).

Os grupos controle e DMG apresentaram diferenças quanto ao número de gestantes usuárias de tabaco (5 *versus* 15, respectivamente) descritos na TABELA 9. Estes achados estão em concordância com os relatos de Solomon *et al.* (1997),

que analisaram fatores de risco para o desenvolvimento de DMG, e verificaram que o uso do tabaco aumenta o risco de desenvolver o DMG: fumantes apresentaram risco de desenvolver DMG de 1,43, comparativamente às não fumantes.

6.1.7 Uso de insulina

No grupo DMG, 82 pacientes necessitaram uso de insulina. Isto reflete pacientes com controle glicêmico inadequado por meio de terapia nutricional e prática de atividade física, primeiras opções de tratamento (TABELA 9).

A insulinoterapia é recomendada se as metas glicêmicas preconizadas não forem alcançadas em duas semanas, por meio de dieta e atividade física. O tratamento farmacológico padrão para o DMG é a insulinoterapia subcutânea. Porém, é complexo, de maior custo, de menor aceitação pelas pacientes, e, pode acarretar ganho indesejado de peso. Como alternativa terapêutica, medicações orais tem se mostrado efetivas e comparáveis ao uso da insulina. As diretrizes e consensos no tema divergem sobre o tratamento farmacológico do DMG. A SBD sugere o uso de insulina como tratamento padrão. Já, o *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) recomenda o uso de metformina, e a *International Diabetes Federation* (IDF) sugere tanto a metformina quanto a glibenclamida como opções de tratamento (PONTES *et al.*, 2010; WEINERT *et al.*, 2011).

6.1.8 Fator de risco para diabetes

O risco de desenvolver diabetes aumenta com a idade, obesidade/sobrepeso e falta de atividade física (SBD, 2006; ADA, 2008; ADA, 2010; ADA, 2012).

Os grupos em estudo divergem significativamente quanto à presença de fatores de risco para o DMG (TABELA 9). O número de gestantes portadoras de fatores de risco para o diabetes no grupo DMG foi superior ao do grupo controle (175 *versus* 1, respectivamente).

Tal achado também está descrito e respaldado na literatura. Solomon *et al.* (1997) relataram que o risco de desenvolver DMG aumenta significativamente com o aumento da idade materna e a presença de história familiar de DM. Estes autores observaram também maior risco de desenvolvimento de DMG em mulheres com

IMC elevado, comparativamente às aquelas com IMC normal. Além disso, verificaram que o uso do tabaco aumenta o risco de desenvolver o DMG.

6.1.9 História familiar de diabetes e DAC

O número de gestantes com história familiar de diabetes e doença arterial coronária (DAC), 138 e 120, respectivamente, no grupo DMG é expressiva (TABELA 9). Para o grupo controle estas informações não foram disponibilizadas.

Outros trabalhos corroboram os achados do presente estudo. Solomon *et al.* (1997) relataram que o risco de desenvolver DMG aumenta significativamente com a presença de história familiar de DM. Legato *et al.* (2006) demonstraram que fatores de risco para DAC, como dislipidemia e estresse oxidativo, apresentam grande impacto para o desenvolvimento de DMG. Rivero *et al.* (2008) estudaram gestantes brasileiras com DMG, e ressaltaram que a alta prevalência de sobrepeso/obesidade e dislipidemia nesta população faz do DMG um fator de alto risco para o desenvolvimento de DAC. Portanto, em concordância com nossos dados, a história familiar de diabetes, principalmente, é um indicador de risco relevante para a patologia.

6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

6.2.1 Marcadores glicêmicos

As concentrações de glicemia de jejum foram significativamente diferentes entre os grupos controle e DMG (83,0 mg/dL *versus* 87,5 mg/dL, respectivamente), o que era esperado em virtude do critério de seleção da amostra, que teve como elemento central a glicemia (TABELA 10).

A determinação da glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose no grupo DMG (média = 164,0 mg/dL) confirma o diagnóstico de DMG. De acordo com a SBD (2009) gestantes que apresentam glicemia ≥ 140 mg/dL 2 horas após a ingestão de 75g de glicose no TOTG, realizado entre a 24ª e 28ª semanas de gestação, são diagnosticadas como diabéticas.

A hemoglobina glicada (HbA1C) é um marcador de controle glicêmico que reflete a média da glicemia em um período prévio de cerca de 2 meses. A redução

na concentração da HbA1C é um indicador de redução do risco para o desenvolvimento e progressão de complicações crônicas do DM, porém, é um marcador que não avalia flutuações/excursões da glicemia decorrentes de hiperglicemia pós-prandial e/ou hipoglicemia (KIM e PARK, 2013). Outros estudos (BALAJI *et al.*, 2007; ADA, 2010) apontam que concentrações de HbA1C superiores a 6,5% mostram controle glicêmico inadequado, e consequente necessidade de intervenção nutricional ou medicamentosa. No presente estudo, a concentração média de HbA1C no grupo de gestantes com DMG (5,7%) indica que se tratam de pacientes diabéticas com bom controle glicêmico na média.

O 1,5 anidroglicitol (1,5 AG) é um monossacarídeo de seis carbonos proveniente da dieta. É absorvido no intestino e distribuído a todos os órgãos e tecidos. É metabolicamente estável, sendo excretado na urina quando seus níveis excedem o limiar renal. É reabsorvido nos túbulos renais, sendo esta reabsorção competitivamente inibida pela glicosúria, levando a redução dos níveis séricos de 1,5 AG em situações de hiperglicemia (YAMANOUCHI e AKANUMA, 1994). As concentrações séricas de 1,5 AG sofrem alteração em 24 horas, como resultado da inibição competitiva de sua reabsorção nos túbulos renais ocasionada pelo aumento da glicemia. Ou seja, quando a glicemia se eleva, mesmo que transitoriamente, a perda urinária de 1,5 AG ocorre, e sua concentração sérica reduz (BUSE *et al.*, 2003). A rápida redução do 1,5 AG sérico durante períodos de hiperglicemia (ou “marés glicêmicas”) fazem com que este biomarcador seja utilizado no monitoramento do DM, como um marcador glicêmico adicional à HbA1C, especialmente como marcador de controle glicêmico recente e de hiperglicemia pós-prandial, ou de excursões glicêmicas além do limiar glicêmico renal. As dosagens de 1,5 AG são úteis na avaliação de excursões hiperglicêmicas, ou seja, em situações de hiperglicemia pós-prandial em pacientes diabéticos que apresentam HbA1C inferior a 8% (KIM e PARK, 2013).

No estudo em tela as concentrações de 1,5 AG foram menores no grupo DMG comparados aos controles (9,5 µg/mL *versus* 14,5µg/mL, respectivamente). BUSE *et al.* (2003) salientaram que devido as alterações na hemodinâmica renal durante a gravidez, o 1,5 AG como biomarcador parece de utilidade limitada na avaliação do DMG. Medições realizadas diária ou semanalmente podem sugerir se o controle glicêmico está estável ou melhorando, quando as concentrações de 1,5 AG estão estáveis ou aumentando, respectivamente. A redução no 1,5 AG é indicador

para uma maior atenção ao monitoramento da glicemia, ao estilo de vida e à terapia medicamentosa da paciente.

6.2.2 Perfil lipídico

O estado hormonal modificado durante a gestação é responsável pelas variações observadas nas concentrações séricas de lípidos (BRIZZI *et al.*, 1999). Tais variações são caracterizadas por uma redução inicial, com as mais baixas concentrações no primeiro trimestre, seguido por um aumento gradual e um pico máximo de concentração de lípidos antes do parto. A hiperlipidemia é comum na segunda metade da gestação, como um mecanismo fisiológico necessário para manter suplementação calórica para o feto. O mecanismo pelo qual a gestação altera o metabolismo de lípidos não é completamente entendido. Estrógenos podem aumentar as concentrações de triglicérides por estimular a produção hepática de VLDL-Colesterol e por inibição da lipoproteína lipase do tecido adiposo e do fígado (WIZNITZER *et al.*, 2009).

Os resultados do perfil lipídico no DMG, apresentados em diferentes estudos ao longo dos anos são conflitantes. No estudo realizado por Koukkou *et al.* (1996), mulheres com DMG apresentaram concentrações de triglicérides mais elevadas, porém, valores menores de LDL-Colesterol, comparativamente ao grupo controle.

As concentrações de colesterol total e HDL-Colesterol não foram significativamente diferentes entre os dois grupos do estudo de Koukkou *et al.* (1996). Os autores concluíram que o desenvolvimento de diabetes durante a gestação induz a um estado de dislipidemia caracterizado por elevadas concentrações de triglicérides, assim como observado em outras situações de resistência à insulina. No entanto, o DMG parece atenuar a elevação nos níveis de LDL-Colesterol. De acordo com os autores, concentrações séricas elevadas de estrógenos e aumento da resistência à insulina no final da gravidez são responsáveis pela hipertrigliceridemia observada durante uma gestação normal. Em mulheres com DMG a resistência aumentada à insulina provoca maiores elevações nas concentrações de triglicérides. No entanto, não se pode explicar completamente a redução nas concentrações de LDL-Colesterol observada em mulheres com DMG. Outros estudos, apresentados no trabalho de Koukkou *et al.* (1996), mostraram resultados conflitantes. Três deles verificaram concentrações mais elevadas de

triglicérides e VLDL-Colesterol no grupo de pacientes com DMG, concentrações mais baixas de LDL-Colesterol no grupo com DMG, mas nenhuma diferença entre as concentrações de colesterol total entre os grupos com DMG e o grupo controle. No entanto, em outro estudo citado, não foram observadas quaisquer diferenças nas concentrações de lípides e lipoproteínas entre mulheres com DMG e o grupo controle. Koukkou *et al.* (1996) acreditam que tais discrepâncias sejam decorrentes de estudos realizados com baixo tamanho amostral, assim como outras diferenças metodológicas.

Brizzi *et al.* (1999) salientaram que o aumento moderado no colesterol total, LDL-Colesterol e triglicérides, principalmente em virtude de elevações nas concentrações de estrogênio, têm sido descritos de forma consistente durante a gestação, enquanto elevações nas concentrações de HDL-Colesterol têm sido observadas por alguns autores, mas não por outros.

O estudo de Toescu *et al.* (2004) demonstrou aumento significativo das concentrações séricas de colesterol total e triglicérides ao longo da gestação, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo com DMG e o grupo controle, sugerindo que as concentrações destes lípides são independentes da existência do estado diabético, sendo simplesmente uma manifestação da gestação. Já, as concentrações de LDL-Colesterol foram significativamente mais elevadas no grupo com DMG, comparativamente aos controles.

Ainda no estudo de Toescu *et al.* (2004), o IMC foi significativamente mais elevado no grupo com DMG, quando comparado aos controles. O IMC mais elevado é reflexo do processo patológico, e pode influenciar as concentrações séricas de lípides, esperando-se valores estatisticamente mais elevados nas mulheres com maior IMC.

No presente estudo foi identificada uma diferença estatisticamente significativa nas concentrações séricas de colesterol total, HDL-Colesterol e triglicérides entre os grupos controle e DMG (TABELA 10). As concentrações séricas destes lípides sendo mais elevadas no grupo de gestantes com DMG. Já, as concentrações de LDL-Colesterol não mostraram diferenças entre os dois grupos. Portanto, os dados obtidos neste estudo são conflitantes quando comparados a outros estudos, exceto em relação à maior concentração de triglicérides observada no grupo com DMG, achado comum em muitos estudos.

No estudo em tela, as gestantes com DMG foram avaliadas com aproximadamente 31 semanas de gestação, enquanto as gestantes do grupo controle, às 17 semanas. Isto é significativo, pois sabe-se que as variações nas concentrações séricas de lípidos são dependentes da idade gestacional. Observa-se uma redução inicial, com as mais baixas concentrações no primeiro trimestre, seguido por um aumento gradual e um pico máximo de concentração de lípidos antes do parto. Ou seja, a hiperlipidemia é comum na segunda metade da gestação, justificando a elevação nas concentrações séricas de colesterol total, HDL-Colesterol e triglicérides no grupo de gestantes diabéticas, e não no grupo controle.

As gestantes pertencentes ao grupo com DMG também apresentaram IMC mais elevado, comparativamente às gestantes do grupo controle. No estudo de Toescu *et al.* (2004), o IMC também foi significativamente mais elevado no grupo com DMG, quando comparado aos controles. O IMC mais elevado é reflexo do processo patológico, e pode influenciar as concentrações séricas de lípidos, esperando-se valores estatisticamente mais elevados nas mulheres com maior IMC, o que também pode justificar a elevação nos níveis séricos de colesterol total, HDL-Colesterol e triglicérides no grupo de gestantes diabéticas, e não no grupo controle no presente estudo.

6.2.3 Proteína total e albumina

As concentrações séricas de proteína total e albumina foram significativamente mais baixas no grupo com DMG, comparativamente ao grupo controle, como apresentado na TABELA 10.

De acordo com Lindheimer *et al.* (2009), grandes incrementos no débito cardíaco, acompanhados de elevações marcantes no volume intravascular, ocorrem rapidamente durante a primeira metade da gestação, após este período atingem um platô e elevam-se mais lentamente. Isto justifica concentrações de proteína total e albumina significativamente mais baixas no grupo com DMG, que teve seus dados coletados mais tardiamente ao longo da gestação, quando elevações no volume intravascular já teriam atingido seus níveis máximos.

A análise conjunta das concentrações séricas de proteína total e albumina permite avaliar, além da retenção de líquidos, também o estado nutricional das gestantes. Assim, pode-se pensar em uma situação socioeconômica diferenciada entre os grupos controle e DMG, sendo menos favorecidas economicamente as

gestantes diabéticas, justificando seu menor aporte protéico e concentrações séricas de proteína total e albumina mais baixas. Porém, esta hipótese parece ser menos provável.

6.2.4 Ureia e creatinina

Ureia e creatinina séricas são os biomarcadores mais amplamente utilizados para detecção de lesões renais (ROSNER, 2009).

As concentrações séricas de ureia e creatinina foram significativamente menores no grupo com DMG, comparativamente ao grupo controle, como mostrado na TABELA 10.

As concentrações de ureia e creatinina significativamente menores no grupo com DMG são explicados pelo maior volume sanguíneo e hemodiluição associada, uma vez que o grupo de pacientes diabéticas teve seus dados coletados mais tardiamente ao longo da gestação, quando elevações no volume intravascular já atingiram seus níveis máximos.

Associado a este fato, há também o aumento no ritmo de filtração glomerular que ocorre fisiologicamente na gestação, reduzindo ainda mais as concentrações séricas destes biomarcadores (FACCA *et al.*, 2012). Salienta-se que um processo hipertensivo concomitante ao aumento do volume sanguíneo eleva ainda mais o ritmo de filtração glomerular, aumentando o *clearance* de ureia e creatinina, reduzindo suas concentrações séricas (LINDHEIMER *et al.*, 2009). Estes dados são significativos, e também explicam os resultados observados neste estudo, uma vez que a proporção de gestantes hipertensas é maior no grupo com DMG, comparativamente ao grupo controle. Relevante ressaltar que não foi identificado em nenhum indivíduo do presente estudo uma lesão renal importante identificada pela ureia ou creatinina.

6.2.5 Ácido úrico

As concentrações séricas de ácido úrico foram significativamente maiores no grupo com DMG, comparativamente ao grupo controle (4,4 mg/dL *versus* 3,4 mg/dL), como mostrado na TABELA 10.

É conhecido que o ritmo de filtração glomerular e o *clearance* do ácido úrico aumentam durante a gestação normal, reduzindo suas concentrações séricas (PASCOAL, 1998), explicando os valores mais baixos observados no grupo controle comparativamente ao grupo com DMG. No grupo com DMG as concentrações séricas de ácido úrico mais elevados são decorrentes da resistência à insulina e hipertensão (YOO *et al.*, 2005).

6.3 ANÁLISES MOLECULARES

Estudos têm sido realizados avaliando-se polimorfismos dos genes *TCF7L2* e *FTO* no diabetes. No entanto, os resultados têm sido contraditórios, com alguns estudos mostrando associação com a patologia, e outros não.

6.3.1 Polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*

A TABELA 12 apresenta os dados referentes aos grupos controle e DMG para o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*. A frequência genotípica do polimorfismo está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, e os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,946$) e alélica ($P=0,829$) entre os grupos estudados. Foram consideradas para comparação com outras populações as frequências do alelo raro para o grupo controle, que diferiram do intervalo de confiança de 95% de 35-45% (TABELA 12).

A TABELA 16 mostra frequências genotípicas e alélicas apresentadas em outros estudos para o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*.

TABELA 16 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9939609 DO GENE *FTO* COM DADOS DA LITERATURA

<i>FTOrs9939609</i>			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	TT	AT	AA	A
Euro-brasileiros	DMG	200	34,0	50,0	16,0	41,0
	Saudáveis	200	35,5	48,5	16,0	40,0
Chineses Han	DM2	1774	74,7	23,4	1,9	13,6
	Saudáveis	1984	78,0	20,7	1,3	11,7
LIU <i>et al.</i> , 2010						
Vietnamitas	DM2	98	55,1	38,8	6,1	25,5
	Saudáveis	251	65,3	33,1	1,6	18,2
BINH <i>et al.</i> , 2012						
Brasileiros	Obesos(IMC≥30kg/m ²)	126	27,0	48,0	25,0	49,0
	Saudáveis(IMC<30kg/m ²)	113	36,0	50,0	13,0	38,0
RAMOS <i>et al.</i> , 2012						
Chineses	Obesos(IMC≥30kg/m ²)	610	69,7	27,3	3,0	16,7
	Saudáveis(IMC<30kg/m ²)	1525	75,9	22,8	1,3	12,7
CHANG <i>et al.</i> , 2008						
Chineses	DM2	238	23,1	72,3	4,6	40,8
	Saudáveis	726	75,7	22,9	1,4	12,9
CHANG <i>et al.</i> , 2008						
Dinamarqueses	DM2	3856	31,0	50,0	19,0	44,0
	Saudáveis	4861	35,0	49,0	16,0	40,5
ANDREASEN <i>et al.</i> , 2008						
Japoneses	Obesos(IMC≥30kg/m ²)	919	58,1	36,3	5,5	23,7
	Saudáveis(IMC<25kg/m ²)	1504	66,8	29,4	3,7	18,4
HOTTA <i>et al.</i> , 2008						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; IMC: índice de massa corporal.

Com relação ao DM, Liu *et al.* (2010) estudaram chineses Han portadores de DM2 e reportaram uma frequência de 14% para o alelo de risco A. Binh *et al.* (2012) avaliaram vietnamitas com DM2 e relataram uma frequência para o alelo A de 25%. Em virtude destas frequências menores do alelo de risco A, pode-se inferir que o polimorfismo rs9939609 não é um contribuinte importante para o DM2 na população de chineses Han e vietnamitas, e há evidências emergentes que outros *SNPs*, que não estão em desequilíbrio de ligação com o rs9939609, possam ser a variante causal da patologia nestas duas populações (CHANG *et al.*, 2008).

A frequência do alelo A (40,8%) descrita para chineses com DM2 no estudo de Chang *et al.* (2008) foi idêntica à frequência observada no estudo em tela (41%). No estudo de Andreasen *et al.* (2008), dinamarqueses portadores de DM2 também apresentaram uma frequência do alelo A (44%) semelhante ao do presente estudo e ao do estudo de Chang *et al.* (2008). Portanto, nestes três estudos citados, não

foram identificadas associações do diabetes ao polimorfismo em questão. A frequência do alelo A na população de dinamarqueses avaliados por Andreasen *et al.* (2008) foi semelhante à do presente estudo, tanto para o grupo controle quanto para o grupo com DM, em virtude da descendência euro-brasileira da população estudada.

Em relação à obesidade, Ramos *et al.* (2012) estudaram uma população de brasileiros e relataram uma frequência elevada para o alelo A de 49% no grupo de obesos, comparativamente à observada para os indivíduos saudáveis (38%).

Chang *et al.* (2008) avaliaram chineses obesos, e Hotta *et al.* (2008) japoneses obesos, e ambos demonstraram frequências do alelo A mais elevadas no grupo de obesos, 17% e 24%, respectivamente, porém bem menores comparativamente ao grupo de brasileiros estudados por Ramos *et al.* (2012). Estas observações corroboram os dados de Frayling *et al.* (2007), que salientaram que o alelo A apresenta associação a elevações do índice de massa corporal (IMC). Ou seja, indivíduos homozigotos para o alelo A do polimorfismo *rs9939609* apresentam risco substancialmente maior de sobrepeso ou obesidade quando comparados aos homozigotos para o alelo T de baixo risco.

Segundo Field *et al.* (2007), o polimorfismo *rs9939609* aumenta o risco de obesidade e DM2, sendo o ganho de peso mediado pelo gene *FTO* o fator que predispõe indivíduos ao DM2. No entanto, apesar de estudos demonstrarem que a associação entre o gene *FTO* e o DM é mediada pelo IMC, investigações recentes mostram que em certas populações o gene *FTO* aumenta a suscetibilidade ao DM2 independente do efeito no ganho de peso, sugerindo que variações no ambiente ou outros fatores genéticos possam contribuir para a associação diferencial observada entre grupos étnicos (LARDER *et al.*, 2011).

A associação do gene *FTO* com a obesidade é robusta em populações de descendência europeia. Estudos negativos publicados envolveram populações não europeias. Evidências sugerem que o polimorfismo *rs9939609* possa estar em desequilíbrio de ligação com uma variante causal em populações de descendência europeia, mas que este desequilíbrio não ocorre em outros grupos étnicos (CECIL *et al.*, 2008). CHEUNG e YEO (2011) complementaram que a associação entre o *SNP rs9939609* e IMC aumentado/obesidade foi replicada e confirmada tanto em adultos quanto em crianças, de múltiplos grupos étnicos. No entanto, a frequência do alelo de risco A é diferente entre os grupos étnicos, sendo próxima a 60% na maioria das

populações europeias, comparada a somente 17% em algumas populações asiáticas.

Segundo Cecil *et al.* (2008), variantes do gene *FTO* parecem conferir risco à obesidade por meio da ingestão calórica aumentada. Indivíduos caucasoides, comparativamente a não caucasoides, portadores do genótipo AA, apresentam resposta reduzida à saciedade, apresentando maior propensão ao acúmulo de gordura corporal. Homozigotos A fazem escolhas alimentares menos saudáveis que os demais. Isto indica uma provável ação hiperfágica do gene, ou seja, desenvolve-se uma postura de consumir preferencialmente alimentos com alta densidade energética. A maior facilidade para o acúmulo de gordura corporal dos homozigotos para o alelo A, associada à redução na percepção da saciedade, podem ser facilitadores da instalação de comorbidades concomitantes à obesidade (LIMA *et al.*, 2010), sugerindo que a restrição da ingestão energética possa prevenir a obesidade associada ao gene *FTO*. Este achado e suas implicações são especialmente importantes, dado o consenso de que a obesidade na infância é um preditor importante da morbimortalidade cardiovascular na vida adulta (CECIL *et al.*, 2008).

Ainda, de acordo com Larder *et al.* (2011), o gene *FTO* é expresso na placenta, e está associado a elevações no peso e tamanho dos bebês, indicando que alguns dos efeitos *exutero* observados podem ser, em parte, resultados de um fator pré-natal.

No estudo realizado não foi observada associação entre o polimorfismo rs9939609 (genótipos e frequências alélicas) e o DMG.

6.3.2 Polimorfismo rs8050136 do gene *FTO*

A TABELA 12 apresenta os dados referentes aos grupos controle e DMG para o polimorfismo em questão. A frequência genotípica do polimorfismo está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, e os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,725$) e alélica ($P=0,771$) entre os grupos estudados. Foram consideradas para comparação com outras populações as frequências do alelo raro para o grupo controle, que diferiram do intervalo de confiança de 95% de 34-44% (TABELA 12)

A TABELA 17 mostra frequências genotípicas e alélicas apresentadas em outros estudos para o polimorfismo rs8050136 do gene *FTO*.

TABELA 17 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs8050136 DO GENE FTO COM DADOS DA LITERATURA

FTOrs8050136			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	CC	AC	AA	A
Euro-brasileiros	DMG	200	36,5	51,0	12,5	38,0
	Saudáveis	200	37,0	48,0	15,0	39,0
Chineses Han	DM2	1748	74,0	24,1	1,8	13,9
	Saudáveis	2015	77,9	20,9	1,2	11,7
LIU <i>et al.</i> , 2010						
Gestantes suecas com DMG	DM2 no pós-parto	126	31,0	49,2	19,8	44,4
	Tolerância normal à glicose no pós-parto	480	37,5	46,5	16,0	39,3
EKELUND <i>et al.</i> , 2012						
Indianos	DM2	851	73,7	24,7	1,6	14,0
	Saudáveis	1001	79,6	19,3	1,1	10,7
RAMYA <i>et al.</i> , 2011						
Coreanos	DM2	864	74,4	24,1	1,5	13,6
	Saudáveis	629	74,4	24,1	1,5	13,6
CHO <i>et al.</i> , 2009						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Com relação ao DM, Liu *et al.* (2010) estudaram chineses Han portadores de DM2 e reportaram uma frequência menor (14%) para o alelo de risco A, mesma frequência reportada por Ramya *et al.* (2011) avaliando Indianos e por Cho *et al.* (2009), que estudaram coreanos com DM2. Estes achados são corroborados por Li *et al.* (2008), que avaliaram a associação de três polimorfismos do gene *FTO* (rs8050136, rs9939609 e rs9930506) à obesidade e ao DM2, em uma população de chineses Han. As frequências dos alelos de risco dos polimorfismos citados foram substancialmente mais baixas que as observadas para populações de descendência europeia, o que levou tais autores a concluir que as variantes estudadas do gene *FTO* não são contribuintes importantes para a obesidade e DM2 em populações orientais.

Por outro lado, os dados citados anteriormente são conflitantes aos descritos em outros estudos. Liu *et al.* (2010) conduziram uma meta-análise dos estudos publicados a respeito dos polimorfismos rs9939609 e rs8050136, para investigar se estes polimorfismos apresentavam ou não associação ao DM2 e obesidade em chineses Han. No estudo, o alelo de risco A do polimorfismo rs9939609, assim como o alelo de risco A do polimorfismo rs8050136, apresentaram associação a um risco aumentado de DM2 e obesidade. Os autores concluíram, portanto, que os

polimorfismos *rs9939609* e *rs8050136* do gene *FTO* contribuem para obesidade e DM2 nesta população asiática. Xi *et al.* (2011) também conduziram uma meta-análise para avaliar a associação dos polimorfismos *rs9939609* e *rs8050136* a obesidade e DM2 em uma população do leste asiático. Estes autores verificaram que tais polimorfismos estão associados tanto à obesidade quanto ao DM2 nesta população. Portanto, estudos adicionais são necessários para se chegar a um consenso a respeito de uma possível associação, ou não, destes polimorfismos ao DM2 e obesidade nestas populações.

Ekelund *et al.* (2012) avaliaram se o *SNPrs8050136* foi capaz de prever o desenvolvimento de DM2 após DMG em gestantes da Suécia. Estes autores reportaram uma frequência do alelo de risco A de 44% nas gestantes que desenvolveram DM2 no pós-parto, e, salientaram que tal polimorfismo foi capaz de prever o DM2 após DMG. No estudo em tela, a frequência do alelo de risco A no grupo com DMG foi similar (38%). No entanto, como bem recomendam Ekelund *et al.* (2012), estudos adicionais, em outras populações, são necessários para confirmação dos resultados.

6.3.3 Polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2*

A TABELA 11 apresenta as comparações genotípicas e alélicas para os grupos controle e DMG para o polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2*. A frequência genotípica do polimorfismo está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, e os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($P=0,085$) e alélica ($P=0,050$) entre os grupos estudados. Foram consideradas para comparação com outras populações as frequências do alelo raro para o grupo controle, que diferiram do intervalo de confiança de 95% de 25-34% (TABELA 11).

A TABELA 18 mostra frequências genotípicas e alélicas apresentadas em outros estudos para o polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2*.

TABELA 18 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7903146 DO GENE *TCF7L2* COM DADOS DA LITERATURA

TCF7L2rs7903146				Genótipo (%)		Alelo (%)	
Grupo étnico		Características	n	CC	CT	TT	T
Euro-Brasileiros		DMG	200	38,0	52,0	10,0	36,0
		Saudáveis	200	49,0	43,0	8,0	29,0
Gestantes com DMG	Suecas	DM2 no pós-parto	125	39,2	44,8	16,0	38,4
		Tolerância normal à glicose no pós parto	476	50,2	41,0	8,8	29,3
EKELUND <i>et al.</i> , 2012							
Suecos		DMG	826	43,9	42,6	10,7	32,0
		Saudáveis	1185	54,3	32,4	6,9	23,1
PAPADOPOULOU <i>et al.</i> , 2011							
Palestinos		DM2	219	25,1	50,2	24,7	49,7
		Saudáveis	114	48,2	44,7	7,0	29,3
EREQAT <i>et al.</i> , 2010							
Nipo-brasileiros		Intolerância à glicose	172	89,1	10,9	0,0	5,5
		Saudáveis	50	89,8	10,2	0,0	5,1
FRANCO <i>et al.</i> , 2011							
Gestantes escandinavas		DMG	585	46,3	43,3	10,1	31,9
		Saudáveis	1111	58,5	35,5	6,2	23,8
SHAAT <i>et al.</i> , 2007							
Italianos		DM2	154	33,8	44,1	22,1	44,1
		Saudáveis	174	50,6	37,4	12,0	30,7
CICCACCI <i>et al.</i> , 2012							

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Polimorfismos do gene *TCF7L2* estão associados a elevações no risco de DM2 em diferentes populações ao redor do mundo (MARQUEZINE *et al.*, 2008).

Ereqat *et al.* (2010) avaliaram a associação do polimorfismo *rs7903146* ao DM2 em palestinos. O alelo T foi significativamente aumentado nos portadores de DM2, sendo sua frequência de 49,7%, e 29,3% no grupo controle. Ciccacci *et al.* (2012) analisaram o polimorfismos *rs7903146* em italianos com DM2 e controles saudáveis. A frequência do alelo de risco T foi de 44,1% no grupo com DM2 e de 30,7% no grupo controle, semelhantes ao estudo de Ereqat *et al.* (2010). A similaridade étnica das populações avaliadas deve ser considerada nestes estudos.

Franco *et al.* (2011) avaliaram se o *SNP* *rs7903146* poderia prever o desenvolvimento de intolerância à glicose na população nipo-brasileira. Diferentemente das populações anteriormente citadas, as frequências dos alelos de risco no grupo com intolerância à glicose (5,5%) e no grupo controle (5,1%) foram cerca de 5 vezes menores que as observadas em no estudo em tela (29%), refletindo possivelmente diferenças nas características da população.

Shaat *et al.* (2007) analisaram a associação do polimorfismo *rs7903146* em relação ao risco de desenvolvimento de DMG em mulheres escandinavas. Observaram uma frequência do alelo de risco de 31,9% no grupo DMG, e 23,8 % no grupo controle. Papadopoulou *et al.* (2011) genotiparam o *SNPs* *rs7903146* em suecas com DMG e controles saudáveis, sendo as frequências do alelo de risco de 32% no grupo DMG e 23,1% no grupo controle. No estudo em tela, as frequências do alelo de risco no grupo DMG (36%) e no grupo controle (29%) foram semelhantes aos estudos citados anteriormente. Salienta-se que tais frequências foram similares em virtude da descendência euro-brasileira e européia das populações avaliadas.

Ekelund *et al.* (2012) examinaram se variantes genéticas que predisõem ao DM2 poderiam prever o desenvolvimento de DM2 após DMG em uma população da Suécia. Verificaram uma frequência do alelo T de risco de 38% no grupo que desenvolveu DM2 no pós-parto, comparativamente a 29% no grupo com tolerância normal à glicose no pós-parto, frequências estas similares ao estudo em tela, já mencionadas anteriormente.

Na comparação das frequências alélicas, deve ser destacado que as diferenças entre os grupos ficaram no limite da significância, com probabilidade de 0,05 para o alelo T. É possível supor que genotipagem para este polimorfismo com maior tamanho amostral possa produzir resultados significativos entre os grupos. Portanto, novos estudos sem este viés são recomendados para novos projetos de pesquisa.

6.3.4 Polimorfismo *rs12255372* do gene *TCF7L2*

A TABELA 11 apresenta os dados referentes aos grupos controle e DMG para o polimorfismo *rs12255372* do gene *TCF7L2*. A frequência genotípica do polimorfismo está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos, e os dados não mostram diferença significativa na distribuição

genotípica ($P=0,205$) e alélica ($P=0,593$) entre os grupos estudados. Foram consideradas para comparação com outras populações as frequências do alelo raro para o grupo controle, que diferiram do intervalo de confiança de 95% de 26-35% (TABELA 11).

A TABELA 19 mostra frequências genotípicas e alélicas apresentadas em outros estudos para polimorfismos rs12255372 do gene *TCF7L2*.

TABELA 19 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs12255372 DO GENE *TCF7L2* COM DADOS DA LITERATURA

<i>TCF7L2</i> rs12255372			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	GG	GT	TT	T
Euro-brasileiros	DMG	200	46,0	44,0	10,0	32,0
	Saudáveis	200	51,0	37,5	11,5	30,0
Suecos	DMG	826	46,9	40,3	9,8	30,0
	Saudáveis	1185	53,4	32,5	7,1	23,3
PAPADOPOULOU <i>et al.</i> , 2011						
Nipo-brasileiros	Intolerância à glicose	172	93,1	6,9	0,0	3,5
	Saudáveis	50	93,6	6,4	0,0	3,2
FRANCO <i>et al.</i> , 2011						
Italianos	DM2	154	33,8	45,4	20,8	44,0
	Saudáveis	182	45,6	44,0	10,4	32,0
CICCACCI <i>et al.</i> , 2012						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DMG: diabetes *mellitus* gestacional; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Ciccacci *et al.* (2012) analisaram o polimorfismo rs12255372 em italianos com DM2 e controles saudáveis. A frequência do alelo de risco T foi de 44,0% no grupo com DM2 e de 32,7% no grupo controle. Franco *et al.* (2011) avaliaram se o *SNP* rs12255372 poderia prever o desenvolvimento de intolerância à glicose na população nipo-brasileira. Diferentemente da população italiana anteriormente citada, as frequências dos alelos de risco no grupo com intolerância à glicose (5,5%) e no grupo controle (5,1%) foram substancialmente menores, refletindo diferenças nas características étnicas da população. No estudo em tela a frequência do alelo raro foi cerca de 10 vezes maior quando comparado a Nipo-Brasileiros (30% *versus* 3,2%).

Papadopoulou *et al.* (2011) genotiparam o *SNP* rs12255372 em suecas com DMG e controles saudáveis, sendo as frequências do alelo de risco de 30% no grupo DMG e 23,3% no grupo controle. No estudo em tela, as frequências do alelo

de risco no grupo DMG (32%) e no grupo controle (30%) foram semelhantes às do estudo citado anteriormente. Salienta-se que tais frequências foram similares em virtude da descendência euro-brasileira e europeia das populações avaliadas.

6.3.5 Comparações entre os polimorfismos genéticos estudados e parâmetros clínicos, antropométricos e bioquímicos para os grupos em estudo

As análises de correlação linear de Pearson foram realizadas empregando-se as variáveis apresentadas nas TABELAS 9 e 10, tanto para os grupos controle quanto DMG.

As TABELAS 13 e 14 mostram as correlações significativas para os polimorfismos *rs12255372* e *rs7903146* do gene *TCF7L2*, e *rs9939609* e *rs8050136* do gene *FTO*, respectivamente. As correlações observadas foram fracas (coeficientes de correlação $r < 0,50$). Portanto, não se pode evidenciar associação entre os polimorfismos em estudo e os parâmetros clínicos, antropométricos e bioquímicos avaliados.

Os grupos em estudo foram então combinados, e a análise de variância foi empregada para avaliar a associação dos genótipos com os biomarcadores e características antropométricas em estudo. Nestas comparações, a probabilidade nas análises de comparações entre os genótipos 2 a 2 foi corrigida com o teste de Tukey HSD (*Honest Significant Difference*).

A TABELA 15 mostra as análises de variância significativas para os polimorfismos do gene *TCF7L2*. O gene *FTO* não apresentou nenhuma associação significativa com os biomarcadores em estudo.

Por meio da análise de variância foi possível avaliar o efeito dos genótipos do polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2* sobre a concentração de triglicérides (FIGURA 10). Uma tendência de aumento das concentrações de triglicérides no genótipo homozigoto de risco TT, comparativamente ao homozigoto CC foi identificada. Portanto, portadores do genótipo homozigoto de risco TT do polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2* estão mais propensos à ocorrência de eventos cardiovasculares, considerando este parâmetro do perfil lipídico como indicador de risco.

O efeito dos genótipos do polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2* foi avaliado quanto à concentração do 1,5 AG (FIGURA 11). Portadores do genótipo

homozigoto TT, de risco, apresentaram concentrações de 1,5 AG menores, comparativamente aos portadores do genótipo homozigoto CC usual. Quando a glicemia se eleva, mesmo que transitoriamente, a maior perda urinária de 1,5 AG ocorre, e sua concentração sérica reduz (BUSE *et al.*, 2003). Desta forma, portadores do genótipo homozigoto de risco TT do polimorfismo *rs7903146* do gene *TCF7L2* podem estar associados a um controle glicêmico menos efetivo.

Resultados similares foram observados para o polimorfismo *rs12255372* do gene *TCF7L2* sobre a concentração do 1,5 AG (FIGURA 12). Portadores do genótipo homozigoto TT de risco apresentaram concentrações menores de 1,5 AG quando comparados aos portadores do genótipo GG.

Estas associações entre os polimorfismos em estudo do gene *TCF7L2* e as concentrações de 1,5 anidroglicitol devem ser avaliadas com cautela. O tamanho amostral do estudo em tela pode ser fator limitante para uma análise mais acurada e com uma estatística com maior qualidade (*Power calculation* alto). No entanto, a tendência observada nos experimentos independentes para os dois polimorfismos sugere que os achados podem ser substanciais e devem ser explorados com maior tamanho amostral em novos estudos.

O índice de massa corporal (IMC) não apresentou associação significativa quando avaliado pelo ensaio de ANOVA para os polimorfismos em estudo, considerando a amostra total. Quando foi realizada uma análise separada por grupos para o polimorfismo *rs8050136* do gene *FTO* em relação ao IMC, o genótipo homozigoto AA de risco mostrou uma tendência de associação com maiores valores de IMC, como observado na FIGURA 13, em particular no grupo com DMG. Portanto, as comparações entre os genótipos e o IMC na amostra total e separada pelos grupos em estudo não apresentou diferenças significativas ($P > 0,05$), exceto no grupo DMG, onde o genótipo AA de risco foi associado significativamente a maior IMC comparado ao genótipo heterozigoto. Este achado é corroborado por dados de literatura. Ahmed *et al.* (2010) demonstraram forte associação do alelo de risco A do *SNP rs8050136* do gene *FTO* com o IMC. Neste estudo, indivíduos homozigotos AA apresentaram uma média de IMC 1,0 kg/m² maior que nos homozigotos CC.

As análises de associação entre polimorfismos genéticos e processos patológicos como diabetes gestacional e biomarcadores desta patologia são relevantes. É importante conhecer as características da população brasileira e ampliar a busca de novos marcadores genéticos que permitam o diagnóstico

molecular da patologia, ou permitam estratificar a população com indicadores de risco/proteção de comorbidades associadas.

7 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos *rs8050136* e *rs9939609* do gene associado à massa adiposa e obesidade (*FTO*) não estão associados ao diabetes gestacional na amostra em estudo.
- As frequências (95%IC) dos alelos raros para os polimorfismos *rs8050136* e *rs9939609*, respectivamente, 39% (34-44%) e 40% (35-45%), do gene *FTO* em gestantes saudáveis são similares ao descritos em outras populações de origem caucasóide, e maiores quando comparadas a populações de origem asiática.
- Os polimorfismos *rs12255372* e *rs7903146* do gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2 (*TCF7L2*) não estão associados ao diabetes gestacional na amostra em estudo.
- As frequências (95%IC) dos alelos raros para os polimorfismos *rs12255372* e *rs7903146* do gene *TCF7L2* em gestantes saudáveis, respectivamente, 30% (26-35%) e 29% (25-34%), são similares ao descritos em outras populações de origem caucasóide, e maiores quando comparados a populações de origem asiática.
- Os genótipos em homozigose para os alelos raros dos polimorfismos *rs7903146* (TT) e *rs12255372* (TT) do gene *TCF7L2* foram associados à menor concentração sérica de 1,5 anidroglicitol na amostra em estudo.
- O genótipo AA do polimorfismo *rs8050136* do gene *FTO* foi associado a um maior índice de massa corporal (IMC) no grupo com diabetes gestacional.

REFERÊNCIAS

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. BrasCardiol.** V. 88 (supp I), 2007.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Portal Cardiol**, 2009.

AHMAD, T. *et al.* The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. **Am Heart J**, v. 160, n. 6, p. 1163-1169, Dec. 2010.

AL-ATTAR, S. *et al.* Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-Caucasian multi-ethnic sample. **Cardiovasc Diabetol**, v. 7, n. 5, p. 2-6, 2008.

ALMÉN, M. S. *et al.* Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. **Genomics**, v. 99, p. 132-137, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, p. 55-60, Jan. 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2010. **Diabetes Care**, v. 33, p.11-51, Jan. 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, Suppl. 1, p. S64-71, Jan. 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.36, Suppl 1, p.S67-74, jan. 2013.

ANDREASEN, C. H. *et al.* Low physical activity accentuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. **Diabetes**, v. 57, p. 95-101, Jan. 2008.

ANDREASEN, C. H.; ANDERSEN, G. Gene-environment interactions and obesity- further aspects of genomewide association studies. **Nutrition**, v. 25, p. 998-1003, 2009.

BAHIA et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**, v.12, n.440, p.2-7, 2012.

BAIK, I.; SHIN, C. Interactions between the *FTO* rs9939609 polymorphism, body mass index, and lifestyle-related factors on metabolic syndrome risk. **NutrResPract.**, v. 6, n. 1, p. 78-85, 2012.

BALAJI, V.; MADHURI, B. S.; ASHALATHA, S.; SHEELA, S.; SURESH, S.;

SESHIAH, V. A1C in gestational *Diabetes mellitus* in Asian Indian women. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1865-1867, 2007.

BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestacionaldiabetesmellitusand its association with type 2 diabetes.**Diabet Med.**, v. 21, p. 103-113, 2004.

BESSESEN, D. H. Update on obesity.**J Clin EndocrinolMetab.**, v. 93, n. 6, p. 2027-2034, June 2008.

BINH, T. Q. et al. Association of the common *FTO* rs9939609 polymorphism with type 2 diabetes, independent of obesity-related traits in a Vietnamese population. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 31–35, Jan. 2013.

BLAKEMORE, A. I. F.; FROGUEL, P. Is obesity our genetic legacy? **J ClinEndocrinolMetab.**, v. 93, Suppl.11, p. S51-S56, Nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao *Diabetes mellitus*: hipertensão arterial e *Diabetes mellitus*. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas – Brasília. **Ministério da Saúde**, p. 102, 2001.

BRIZZI, P.; TONOLO, G.; ESPOSITO, F.; PUDDU, L.; DESSOLE, S.; MAIOLI, M.; MILIA, S. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 2, p. 430-434, 1999.

BRYAN, L. A. Genetics of *Diabetes mellitus* (Screening and sequencing for monogenic or inherited forms) **Arnold O. Beckman Conference**, 2007.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestacional diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, v. 115, p. 485-491, Mar. 2005.

BUCHANAN, T. A. et al. What is gestacional diabetes? **Diabetes Care**, v.30, p.105-111, July 2007.

BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational *Diabetes mellitus*. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1256S-1261S, 2000.

CARPENTER, M. W. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S246-250, 2007.

CECIL, J. E. et al. An obesity-associated *FTO* gene variant and increased energy intake in children.**N Engl J Med**, v. 359, n. 24, p. 2558-2566, Dec. 2008.

CHANG, Y. et al. Common variation in the fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene confers risk of obesity and modulates BMI in the Chinese population. **Diabetes**, v. 57, p. 2245-2252, Aug. 2008.

CHEN, Y. *et al.* Cost of gestational diabetes mellitus in the United States in 2007. **PHM**, v. 12, n. 3, p. 165-174, 2009.

CHEUNG, M. M.; YEO, G. S. H. FTO biology and obesity: why do a billion of us weigh 3 kg more? **FENDO**, v. 2, p. 1-9, Feb. 2011.

CHEUNG, W. W.; MAO, P. Recent advances in obesity: genetics and beyond. **ISRN Endocrinol**, p. 1-11, v. 2012, 2012.

CHO, Y. M. *et al.* Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. **Diabetologia**, v. 52, p. 253-261, 2009.

CICCACCI, C. *et al.* TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. **Acta Diabetol.**, v. 50, n. 5, p. 789-99, July 2012.

CORNELIS, M. C. *et al.* TCF7L2, dietary carbohydrate, and risk of type 2 diabetes in US women. **Am J Clin Nutr.**, v. 89, n. 4, p. 1256-1262, Apr. 2009.

DABELEA, D. *et al.* Association testing of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in multi-ethnic youth. **Diabetologia**, v. 54, n. 3, p. 535-539, Mar. 2011.

DAHLGREN, A. *et al.* Variants of the TCF7L2 gene are associated with beta cell dysfunction and confer an increased risk of type 2 diabetes mellitus in the ULSAM cohort of Swedish elderly men. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1852-1857, Sept. 2007.

DAMCOTT, C. M. *et al.* Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish. **Diabetes**, v. 55, p. 2654-2659, Sept. 2006.

DEN HOED, M. *et al.* Postprandial responses in hunger and satiety are associated with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in *FTO*. **Am J Clin Nutr.**, v. 90, p. 1426-1432, 2009.

DINA, C. *et al.* Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 724-726, June 2007.

DIB, S.A. Heterogeneity of type 1 *Diabetes mellitus*. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.52, n.2, p. 205-218, 2008.

DOBIASOVA M.; URBANOVA Z.; RAUCHOVA H.; SAMANEK M.; FROHLICH J.J. High density lipoprotein subclasses and esterification rate of cholesterol in children: effect of gender and age. **Acta Paediatr**, v.87, p. 918-923, 1998.

DUTRA, L. A. S. *et al.* Allele-specific PCR assay to genotype SNP rs7903146 in TCF7L2 gene for rapid screening of diabetes susceptibility. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.52, p. 1362-1366, 2008.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009/ Sociedade Brasileira de Diabetes - [3.ed.] – Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

EKELUND, M. *et al.* Prediction of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 53, p. 452-457, 2010.

EKELUND, M. *et al.* Genetic prediction of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 97, n. 3, p. 394-398, Sept. 2012.

ELBEIN, S. C. *et al.* Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and type 2 diabetes, glucose homeostasis traits and gene expression in US participants of European and African descent. **Diabetologia**, v. 50, n. 8, p. 1621-1630, Aug. 2007.

EREQAT, S. *et al.* Association of a common variant in TCF7L2 gene with type 2 diabetes mellitus in the Palestinian population. **Acta Diabetol.**, v. 47, Suppl. 1, p. 195-198, Dec. 2010.

FRANCO, L. F. *et al.* Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and incident glucose intolerance in Japanese-Brazilians. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n. 3, p. 240-244, Mar. 2011.

FIELD, S. F. *et al.* Analysis of the obesity gene *FTO* in 14,803 type 1 diabetes cases and controls. **Diabetologia**, v. 50, p. 2218-2220, 2007.

FLOREZ, J. C. *et al.* TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the diabetes prevention program. **N Engl J Med.**, v. 355, p. 241-250, July 2006.

FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v. 316, p. 889-894, May 2007.

FRAYLING, T. M. A new era in finding type 2 diabetes genes – the unusual suspects. **Diabet Med.**, v. 24, n. 7, p. 696-701, July 2007.

GIRGIS, C. M.; GUNTON, J. E.; CHEUNG, N. W. The influence of ethnicity on the development of type 2 diabetes mellitus in women with gestational diabetes: a prospective study and review of the literature. **ISRN Endocrinol**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

GRANT, S. F. A. *et al.* Association analysis of the *FTO* gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. **Plos One**, v. 3, n. 3, p. 1-6, Mar. 2008.

GROVES, C. J. *et al.* Association analysis of 6736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. **Diabetes**, v. 55, p. 2640-2644, Sept. 2006.

GUO, Y. *et al.* The fat mass and obesity associated gene, *FTO*, is also associated with osteoporosis phenotypes. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1-5, Nov. 2011.

GUPTA, V. *et al.* Emergence of TCF7L2 as a most promising gene in predisposition of diabetes type II. **Int J Hum Genet.**, v. 8, p.199-215, 2008.

HARDY, R. *et al.* Life course variations in the associations between *FTO* and *MC4R* gene variants and body size. **HumMolGenet.**, v. 19, n. 3, p. 545-552, Oct. 2010.

Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. **Diabetes**, v.58, p.453-459, 2009.

HARRIES, L. W. *et al.* Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and phenotype in monogenic diabetes. **Hum Mol Genet.**, v.15, p. 2216-2224, June 2006.

HAYASHI, T. *et al.* Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. **Diabetologia**, v.50, p. 980 –984, 2007.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2002.

HORVATH, K. *et al.* Effects of treatment in women with gestational diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 340, p. 1-18, 2010.

HOTTA, K. *et al.* Variations in the *FTO* gene are associated with severe obesity in the Japanese. **J Hum Genet.**, v. 53, p. 546-553, 2008.

JACOBSSON J. A.; SCHIÖTH H. B.; FREDRIKSSON R. The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene *FTO*. **Obes Rev.**, v. 13, n. 12, p. 1096-1109, Dec. 2012.

JIMÉNEZ, E. G. Genes y obesidad: una relación de causa-consecuencia. **EndocrinolNutr.**, v. 58, p. 492-496, 2011.

KAKLAMANI, V. *et al.* The role of the fat mass and obesity associated gene (*FTO*) in breast cancer risk. **BMC Medical Genetics**, v. 12, n. 52, p. 1-10, 2011.

KIM, C. *et al.* Gestacional diabetes and the incidence of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1862-1868, Oct. 2002.

KLEIN, K. *et al.* Transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus. **JMatern Fetal Neonatal Med.**, v. 25, n. 9, p. 1783-1786, Sept. 2012.

KORPI-HYÖVÄLTI, E. *et al.* How can we increase postpartum glucose screening in women at high risk for gestational diabetes mellitus? **Int J Endocrinol.**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational *Diabetes mellitus*: a cross-sectional and prospective study. **J**

Clin Pathol, v. 49, n. 8, p. 634-637, 1996.

LABAYEN, I. *et al.* Association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: a possible link with energy balance control. The HELENA study. **IJO**, v. 35, p. 66-71, 2011.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 19, n. 19, p. 5444, Oct. 1991.

LAPPALAINEN, T. *et al.* Association of the fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene variant (rs9939606) with dietary intake in the Finnish Diabetes Prevention Study. **Br J Nutr.**, p. 1-7, 2012.

LARDER, R. *et al.* Where to go with *FTO*? **Trends Endocrin Met**, v. 22, n. 2, p. 53-58, Feb. 2011.

LAUENBORG, J. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 94, p. 145-150, Jan. 2009.

LAWRENCE, J. M. *et al.* Prevalence and timing of postpartum glucose testing and sustained glucose dysregulation after gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. 3, p. 569-576, Mar. 2010.

LÉDA, A. R. O. Polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) em genes codificadores de citocinas e suas correlações com parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes portadores do Vírus da imunodeficiência humana. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

LEGATO, M. J. *et al.* Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. **Gend Med**. v.3, n.2, p. 31-58. 2006.

LE BACQUER, O. *et al.* TCF7L2 splice variants have distinct effects on beta-cell turnover and function. **Hum Mol Genet.**, v. 20, n. 10, p. 1906-1915, May 2011.

LI, H. *et al.* Variants in the fat mass- and obesity associated (*FTO*) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. **Diabetes**, v. 57, p. 264-268, Jan. 2008.

LIMA, W. A.; GLANER, M. F.; TAYLOR, A. P. Fenótipo da gordura, fatores associados e o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*. **Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.**, v. 12, n. 2, p. 164-172, 2010.

LINDHEIMER, M. D.; TALER, S. J.; CUNNINGHAM, F. G. ASH position paper: hypertension in pregnancy. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 11, n. 4, p. 214-225, 2009.

LIU, G. *et al.* *FTO* variant *rs9936609* is associated with body mass index and waist circumference, but not with energy intake or physical activity in European- and African-American youth. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 57, p. 1-12, 2010.

LIU, Y. *et al.* Meta-analysis added power to identify variants in *FTO* associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. **Obesity**, v. 18, n. 8, p. 1619-1624, Aug. 2010.

LOOS, R. J. F. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. **Best Pract Res Clin En**, v. 26, n. 2, p. 211-226, Apr. 2012.

LYSSENKO, V. *et al.* Mechanisms by which common variants in the *TCF7L2* gene increase risk of type 2 diabetes. **J Clin Invest.**, v. 117, n. 8, p. 2155-2163, Aug. 2007.

MAGANHA, C. A. *et al.* Management of gestational diabetes. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 49, n. 3, p. 330-334, 2003.

MARINHO, M. G. S. *et al.* Análise de custos da assistência à saúde aos portadores de diabetes melito e hipertensão arterial em uma unidade de saúde pública de referência em Recife – Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, p. 55-56, 2011.

MARQUEZINE, G. F. *et al.* *TCF7L2* variant genotypes and type 2 diabetes risk in Brazil : significant association, but not a significant tool for risk stratification in the general population. **BMC Medical Genetics**, v. 9, p.1-8, Dec. 2008.

MARSEILLE-TREMBLAY, C.; ETHIER-CHIASSEON, M.; FOREST, J. C.; GIGUERE, Y.; MASSE, A.; MOUNIER, C.; LAFOND, J. Impact of maternal circulating cholesterol and gestational *Diabetes mellitus* on lipid metabolism in human term placenta. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 6, p. 1054-1062, 2008.

MAUAD FILHO, F. *et al.* Diabetes e gravidez: aspectos clínicos e perinatais. **RBGO**, v. 20, p.193-198, 1998.

MEI, H. *et al.* Influences of *FTO* gene on onset age of adult overweight. **Human Genetics**, v. 131, n. 12, p. 1851-1859, Dec. 2012.

MEYRE, D. Is *FTO* a type 2 diabetes susceptibility gene? **Diabetologia**, v. 55, p. 873-876, 2012.

MILLER, R.P. RxC: A program for the analysis of contingency tables via the Metropolis Algorithm. **Computer software distributed by author**, 1997.

MONTGOMERY, S. M.; EKBOM, A. Smoking during pregnancy and diabetes mellitus in a British longitudinal birth cohort. **BMJ**. v.324, n.7328, p. 26-7. 2002.

MOONESINGHE, R. *et al.* Estimating the contribution of genetic variants to difference in incidence of disease between population groups. **Eur J Hum Genet**, v. 20, n. 8, p. 831-836, Aug. 2012.

MOTA, L. M. H. *et al.* Ausência de associação entre o genótipo CC do polimorfismo rs7903146 no gene TCF7L2 e artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 52, n. 4, p. 518-528, 2012.

NAIDU, R. ; YIP, C. H. ; TAIB, N. A. Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 rs1225372(G/T) or rs7903146(C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. **Med Oncol.**, v. 29, n. 2, p. 411-417, June 2012.

NCBI Single nucleotide polymorphism. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

NEWELL, A. M. Genetics for targeting disease prevention: diabetes. **Prim Care**, v. 31, n. 3, p. 743-766, 2004.

OLSZEWSKI, P. K. *et al.* Fto colocalizes with a satiety mediator oxytocin in the brain and upregulates oxytocin gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 408, p. 422-426, 2011.

OSMARK, P. *et al.* Unique splicing pattern of the TCF7L2 gene in human pancreatic islets. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 850-854, May 2009.

OWEN, K. R. *et al.* The clinical application of non-genetic biomarkers for differential diagnosis of monogenic diabetes. **Diabetes Res Clin Pr**, v. 86, p. 15-21, 2009.

PAPADOPOULOU, A. *et al.* Gestational diabetes mellitus is associated with TCF7L2 gene polymorphisms independent of HLA-DQB1*0602 genotypes and islet cell autoantibodies. **Diabet Med.**, v. 28, n. 9, p. 1018-1027, Sept. 2011.

PENG, S. *et al.* FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 9, n. 71, p. 1-15, 2011.

PIRKOLA, J. *et al.* Risks of overweight and abdominal obesity at age 16 years associated with prenatal exposures to maternal prepregnancy overweight and gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 1115-1121, May 2010.

PROKUNINA-OLSSON, L. *et al.* Tissue-specific alternative splicing of TCF7L2. **Hum Mol Genet.**, v. 18, n. 20, p. 3795-3804, Oct. 2009.

RADHA, V. *et al.* Identification of novel variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α gene in south Indian patients with maturity onset diabetes of young. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, p. 1959-1965, 2009.

RAITAKARI, O. T. *et al.* Variation of the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene predicts impaired fasting glucose in healthy young adults. **Diabetes Care**, v. 30, p. 2299-2301, Sept. 2007.

RAMOS, A. V. *et al.* The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. **BMC Med Genet**, v. 13, n. 101, p. 1-9, 2012.

RIVERO, K. *et al.* Prevalence of the impaired glucose metabolism and its association with risk factors for coronary artery disease I women with gestational diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 79, n.3, p. 433-7. 2008.

ROBITAILLE, L.; GRANT, A. M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. **Genet Med.**, v. 10, p. 240-250, Apr. 2008.

ROOT, A. W. Fat mass and obesity associated gene (*FTO*). **GGH Journal**, v. 26, n. 1, p. 8-10, Sep. 2010.

ROSNER, M. H. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. **Adv Clin Chem**, v. 49, p. 73-97, 2009.

RYAN, E. A. Diagnosing gestational diabetes. **Diabetologia**, v. 54, p. 480-486, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SAXENA, R. *et al.* Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. **Diabetes**, v. 55, p. 2890-2895, Oct. 2006.

SCHUM, J. *et al.* Variants of the *FTO* gene in obese children and their impact on body composition and metabolism before and after lifestyle intervention. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 120, n. 3, p. 128-31, Mar. 2012.

SHAAT, N. *et al.* A variant in the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene is associated with an increase risk of gestacional diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 50, p. 972-979, 2007.

SMITH, U. *TCF7L2* and type 2 diabetes-we WNT to know. **Diabetologia**, v. 50, n. 1, p. 5-7, Jan. 2007.

SOLOMON, C. G.; CARROLL, J. S.; OKAMURA, K.; GRAVES, S. W.; SEELY, E. W. Higher cholesterol and insulin levels in pregnancy are associated with increased risk for pregnancy-induced hypertension. **Am J Hypertens**, v. 12, n. 3, p. 276-282, 1999.

SOVIO, U. *et al.* Association between common variation at the *FTO* locus and changes in body mass index from infancy to late childhood: the complex nature of genetic association through growth and development. **PlosGenetics**, v. 7, n. 2, p. 1-13, Feb. 2011.

STEEMBURGO, T.; AZEVEDO, M. J. ; MARTÍNEZ, J. A. Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 5, p. 497-508, 2009.

TOESCU, V.; NUTTALL, S. L.; MARTIN, U.; NIGHTINGALE, P.; KENDALL, M. J.; BRYDON, P.; DUNNE, F. Changes in plasma lipids and markers of oxidative estresse in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clin Sci**

(Lond), v. 106, n. 1, p. 93-98, 2004.

TONG, Y. *et al.* Association between *TCF7L2* gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 diabetes mellitus: a large human genome epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. **BMC Medical Genetics**, v. 10, n. 15, p. 1-25, 2009.

TORLONI, M. R. *et al.* Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Obes Rev**, v. 10, p. 194-203, 2008.

TUNG, Y. L.; YEO, G. S. H. From GWAS to biology: lessons from FTO. **Ann.N.Y. Acad. Sci.**, v. 1220, p. 162-171, 2011.

VISSER, G. H. A.; VALK, H. W. Gestational diabetes: screening for all, which test and which treatment? **Expert Rev. Endocrinol. Metab.**, v. 7, n. 2, p. 165-167, 2012.

WANG, H. *et al.* Genetic variants in *FTO* associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. **MolBiol Rep.**, v. 39, n. 5, p. 5691–5698, May 2012.

WATANABE, R. M. *et al.* Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, p.134-140, July 2007.

WEEDON, M. N. *et al.* A large-scale association analysis of common variation of the *HNF1 α* gene with type 2 diabetes in the U.K.caucasian population .**Diabetes**, v. 54, p. 2487-2491, Aug. 2005.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27,n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WIZNITZER, A.; MAYER, A.; NOVACK, V.; SHEINER, E.; GILUTZ, H.; MALHOTRA, A.; NOVACK, L. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational *Diabetes mellitus*: a population-based study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 201, n. 5, p. e481-488, 2009.

WITTWER, C. T.; KUSUKAWA, N. Nucleic acid techniques. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. 4 ed. Elsevier: St. Louis, 2006, p. 1407-1449.

WHO.Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus. **Geneva: World Health Organization**, n. 32, p. 1-82, 2006.

WHO. WHO Report on the global tobacco epidemic. **Geneva World Helath Organization**, 2009.

WOEHNING, A. *et al.* The A-allele of the common FTO gene variant rs9939609 complicates weight maintenance in severe obese patients.**Int J Obesity**. v. 37, n. 1, p. 135-139, Jan. 2013.

WOOLLETT, L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol

from the maternal to the fetal circulation. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 6, p. 1155-1161, 2005.

XI, B. *et al.* FTO gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in East Asian populations: an update. **Obesity**, v. 19, n. 2, p. 236-237, Feb. 2011.

XIANG, A. H. *et al.* Detailed physiological characterization of the development of type 2 diabetes in Hispanic women with prior gestational diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 59, p. 2625-2630, Oct. 2010.

YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S. Uncovering the biology of FTO. **Mol Metab**, v. 1, p. 32-36, Dec. 2012.

YOO, T. W.; SUNG, K. C.; SHIN, H. S.; KIM, B. J.; KIM, B. S.; KANG, J. H.; LEE, M. H.; PARK, J. R.; KIM, H.; RHEE, E. J.; LEE, W. Y.; KIM, S. W.; RYU, S. H.; KEUM, D. G. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**, v. 69, n. 8, p. 928-933, 2005.

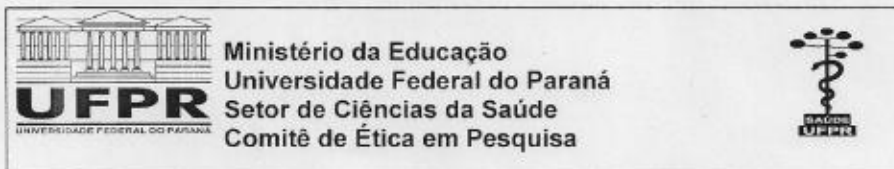
ZHANG, X.; DECKER, A.; PLATT, R. W.; KRAMER, M. S. How big is too big? The perinatal consequences of fetal macrosomia. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 198, n. 5, p. 511-516, 2008.

ZHANG, B. *et al.* Association of TCF7L2 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Han Chinese population: a meta-analysis. **Gene**, v. 512, n. 1, p. 76-81, 2013.

ZHOU, D. *et al.* Common variant (rs9939609) in the *FTO* gene is associated with metabolic syndrome. **Mol Biol Rep.**, v. 39, n. 6, p. 6555-6561, June 2012.

ANEXO 1

**Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de
Ciências da Saúde da UFPR**



Curitiba, 11 de março de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Sandra Fabricio de Melo
Geraldo Pichet

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

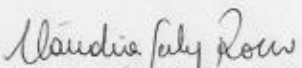
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo de variações do gene do fator de transcrição 7 semelhante a 2 (TCF7/L2), gene associado à massa adiposa e obesidade (FTO) e gene do fator nuclear hepatocitário 1-alfa (HNF1-alfa) no diabetes gestacional"** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 15 de fevereiro de 2011.

Registro **CEP/SD:** 1045.170.10.11 **CAAE:** 5876.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório parcial e/ou final: 15/08/2011.

Atenciosamente


Prof. Dr. Cláudia Seely Rocco
 Coordenadora do Comitê de Ética em
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
Prof. Dr. Cláudia Seely Rocco
 Coordenadora do Comitê de Ética
 em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – C. EP 80060-240
 Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2

Método de extração de DNA genômico

Modificações no método de Lahiri e Nurberger, 1991

1. Vestir o guarda-pó, usar óculos de proteção e calçar luvas;
2. Coletar de 3 a 5 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante EDTA;
3. Remover as luvas usadas, desprezando-as no lixo hospitalar e calçar novo par de luvas;
4. Limpar a bancada de trabalho com hipoclorito de sódio 0,5% e aguardar secar;
5. Limpar a bancada com álcool 70% e forrá-la com papel filtro (folhas de 28 x 60 cm);
6. Verificar se as alíquotas de todos os reagentes utilizados e mantidos em temperatura ambiente encontram-se sobre a bancada de trabalho em quantidades suficientes para as extrações de DNA planejadas. Substituir diariamente a água ultrapura por uma nova alíquota;
7. Centrifugar a amostra de sangue, no próprio tubo de coleta, a 4.000 rpm por 10 minutos;
8. Abrir o tubo com auxílio de um pedaço de gaze, sem descartar a tampa;
9. Retirar o plasma da amostra com auxílio de uma micropipeta;
10. Separar o creme leucocitário (*buffycoat*) utilizando micropipeta e transferi-lo para um microtubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL previamente identificado com o nome da amostra;
11. Em outro microtubo identificado, adicionar, com auxílio de micropipeta, 900 µL de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% e 250 µL de creme leucocitário;
12. Homogeneizar em agitador do tipo vortex;
13. Centrifugar o microtubo em minicentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos;
14. Desprezar cuidadosamente o sobrenadante por inversão, em recipiente plástico para lixo hospitalar, deixando aproximadamente 500 µL de material no microtubo;
15. Com auxílio de micropipeta, completar o volume do microtubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) e homogeneizar em vortex;

16. Centrifugar em microcentrífuga a 10.000 rpm por 5 minutos;
17. Desprezar todo o sobrenadante por inversão, em recipiente para lixo hospitalar;
18. Repetir as etapas de 15 a 17 até que o sedimento esteja limpo;
19. Completar o microtubo, com auxílio de micropipeta, com água ultrapura, homogeneizar em vortex e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
20. Desprezar todo o sobrenadante por inversão, em recipiente para lixo hospitalar;
21. Adicionar ao microtubo, nesta ordem: 40 µL de tampão da proteinase K, 20 µL de proteinase K, 10 µL de SDS 20% e 120 µL de água ultrapura, com auxílio de micropipeta;
22. Homogeneizar o microtubo em vortex, incubar em banho-maria a 65°C por 20 minutos. Agitar em vortex novamente e incubar por mais 20 minutos;
23. Retirar o microtubo do banho-maria e deixar atingir temperatura ambiente antes de prosseguir;
24. Adicionar 100 µL de NaCl 6M, agitar no vortex por cerca de 40 segundos e centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos;
25. Transferir, utilizando micropipeta, o sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL, acrescentar 700 µL de etanol absoluto, inverter gentilmente várias vezes até que se observe a precipitação do DNA;
26. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos;
27. Desprezar o sobrenadante, adicionar 700 µL de etanol 70% ao microtubo e homogeneizar em vortex até que o botão de DNA desprenda-se do fundo do microtubo;
28. Centrifugar em minicentrífuga a 13.000 rpm por 2 minutos;
29. Desprezar o sobrenadante e colocar o microtubo, com a tampa aberta para secar o DNA, em temperatura ambiente, estufa a 37°C ou bloco de aquecimento a 65°C. Deixar o microtubo secando até que o botão de DNA apresente um aspecto claro (transparente);
30. Depois de seco, ressuspender o DNA com 80 a 100 µL de água ultrapura, dependendo do tamanho do botão;
31. Homogeneizar bem com auxílio do agitador vortex;
32. Deixar o microtubo a 65°C por 1 hora para que o DNA fique em suspensão;

33. Guardar todos os reagentes e materiais utilizados;
34. Colocar o frasco utilizado para descarte de lixo hospitalar dentro de uma bombona de resíduos identificada com o símbolo universal de material biológico infectante;
35. Retirar o papel de filtro usado da bancada. Limpá-la com hipoclorito de sódio 0,5%, esperar secar e passar álcool 70%.